

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Kateřina Zemanová**

Úloha signalizace přes substrátovou doménu proteinu p130Cas pro migraci, invazivitu a metastázování  
nádorových buněk

The role of p130Cas substrate domain mediated signalling in cancer cell migration, invasiveness and  
metastasis of cancer cells

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Brábek, Ph.D.

Praha 2020



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis

## **Poděkování**

Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Janu Brábkovi, Ph.D. za vstřícný přístup, užitečné rady, ochotu a především čas, který mi při psaní této bakalářské práce věnoval.

## Abstrakt

p130Cas (Crk-associated substrate) byl poprvé popsán před více než 30 lety jako protein, který asociuje s onkoproteiny *v-src* a *v-crk* a který je hojně fosforylován. Proteiny z rodiny CAS jsou nedílnou součástí buněčně biologických procesů za normálních i patologických situací. Pro substrátovou doménu je charakteristické 15 opakování motivu YXXP. p130Cas je adaptorový protein, který podporuje interakce mezi proteiny nezbytné pro tvorbu multiproteinových komplexů. Protein p130Cas reguluje tyto multiproteinové komplexy, které dále řídí chemotaxi, apoptózu, diferenciaci a migraci. Nadprodukce proteinů CAS byla zaznamenána v souvislosti se špatnou prognózou a zvýšeným výskytem metastáz. Stejně tak souvisí zvýšená produkce proteinů z CAS rodiny s rezistencí na některé druhy chemoterapeutik.

**Klíčová slova:** adaptorový protein, BCAR1, p130Cas, Crk,  
FAK, migrace, Src, substrátová doména

## Abstract

p130Cas (Crk-associated substrate) was first described over 30 years ago as a protein that associates with the *v-src* and *v-crk* oncoproteins and undergoes tyrosine phosphorylation. Proteins of the CAS family are an important part of cellular biological processes in normal and pathological situations. The existence of 15 YXXP repetitive motifs is characteristics for substrate domain. p130Cas is an adapter protein that allows interactions between proteins that lead to assembly of multiprotein complexes. The p130Cas protein regulates these multiprotein complexes, which further drive chemotaxis, apoptosis, differentiation and migration. Overproduction of CAS proteins was found in connection with a poor prognosis and an increased incidence of metastases. Also, the elevated expression of proteins of the CAS family is related to resistance to some types of chemotherapeutics.

**Keywords:** adapter protein, BCAR1, p130Cas, Crk,  
FAK, migration, Src, substrate domain

## Seznam zkratek

<b>Abl</b>	Abelson murine leukemia virus onkogene
<b>Arp 2/3</b>	actin-related proteins 2/3
<b>BCAR1</b>	breast cancer anti-estrogen resistance protein 1
<b>C3G</b>	Crk SH3 domain binding guanine nucleotide releasing factor
<b>CAS</b>	Crk associated substrate
<b>CCH</b>	C-terminální homologie rodiny CAS
<b>Cdc42</b>	cell division control protein 42
<b>CE</b>	chicken embryo cells
<b>CED12</b>	C. elegans death gene
<b>CIZ</b>	CAS interacting zinc finger
<b>DOCK180</b>	dedicator of cytokinesis
<b>ECM</b>	extracelulární matrix
<b>EFS</b>	embryonal Fyn substrate
<b>ELMO1</b>	engulfment and cell motility 1
<b>ELMO2</b>	engulfment and cell motility 2
<b>FA</b>	fokální adheze
<b>FAK</b>	fokální adhezní kináza
<b>FAT</b>	focal adhesion targeting domain
<b>FERM</b>	ezrin, radixin, moesin homology
<b>Fyn</b>	tyrozin kináza rodiny Src
<b>GEF</b>	guanine nucleotide exchange factors
<b>GTP</b>	guanosintrifosfát
<b>HEF1</b>	human enhancer of filamentation
<b>HEPL</b>	HEF1-EFS-p130Cas-like protein
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminalní kináza
<b>MMP-2</b>	matrixová metaloproteináza 2
<b>MMP-9</b>	matrixová metaloproteináza 9
<b>MT1-MMP</b>	membrane type I-matrix metalloproteinase

<b>N-WASP</b>	neural-Wasp
<b>Nck1</b>	non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1
<b>Nck2</b>	non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2
<b>NEDD9</b>	neural precursor cell expressed, developmentally down regulated 9
<b>PTB</b>	phosphotyrosine-binding domain
<b>PTP1B</b>	protein tyrosine phosphatase 1B
<b>PTP-PEST</b>	protein tyrosine phosphatase proline/glutamic acid/serine/threonine-rich domain
<b>Rac</b>	ras-related C3 botulinum toxin substrate
<b>Rap1</b>	ras-related protein 1
<b>Ras</b>	rat sarcoma virus
<b>SBD</b>	Src vazebná doména
<b>Scar1</b>	jiné označení proteinu WAVE
<b>SD</b>	substrátová doména
<b>SH2</b>	Src-homology 2 domain
<b>SH3</b>	Src-homology 3 domain
<b>SIN</b>	Src interacting protein
<b>Toca-1</b>	transducer of Cdc42-dependent actin assembly protein 1
<b>v-Crk</b>	viral Crk
<b>v-Src</b>	viral Src
<b>WASP</b>	Wiskott–Aldrich Syndrome protein
<b>WAVE</b>	WASP-family verprolin-homologous protein
<b>WICH</b>	další N-WASP vazebný protein
<b>WIP</b>	WASP-interacting protein

# Obsah

Úvod.....	1
Cíle práce .....	2
1   Ostatní členové rodiny CAS .....	3
2   Struktura proteinu p130Cas .....	4
2.1   Strukturální vlastnosti .....	4
2.2   Substrátová doména .....	5
3   Fosforylace.....	6
3.1   Různé typy fosforylace .....	6
3.1.1   Tyrozinová fosforylace v transformovaných buňkách.....	6
3.1.2   Tyrozinová fosforylace v netransformovaných buňkách .....	7
3.1.3   Procesivní fosforylace.....	8
3.1.4   Serin/threoninová fosforylace .....	9
3.2   Defosforylace .....	9
3.3   Fokální adheze .....	10
3.3.1   Fokální adhezní kináza.....	10
4   Mechanosensing.....	11
5   Signalizace vedoucí k migraci buněk.....	13
5.1   Migrace .....	13
5.2   Dráha p130Cas-SD/Crk/DOCK 180/Rac vedoucí k tvorbě lamelipodií.....	14
5.2.1   Crk.....	15
5.3   Protein Nck .....	18
5.4   p130Cas-SH3/Zyxin/CIZ/MMP.....	19
5.5   p130Cas-SD/Crk/JNK/MMP2/9 .....	19
5.6   Dráha p130Cas-SD/Crk/DOCK180/Rac vedoucí k tvorbě podosomů/invadopodií (přes N-WASP).....	20
5.7   Dráha přes Cdc42 vedoucí k tvorbě invadopodií.....	20
6   Úloha proteinu p130Cas v nádorech.....	21
Závěr .....	22
Seznam obrazových příloh.....	23
Seznam použité literatury .....	24



# Úvod

Protein p130Cas byl zprvu identifikován jako protein o velikosti 130kDa obsahující fosfotyrosin v buňkách transformovaných onkogeny *v-crk* (Matsuda et al., 1990) a *v-src* (Reynolds et al., 1989). Sakai et al. následně prokázali, že protein p130Cas interaguje s proteiny Crk a Src a je přímo fosforylován kinázou Src (Sakai et al., 1994).

p130Cas je protein složený z mnoha funkčních domén a tato struktura naznačuje, že se jedná o adaptorový protein. p130Cas má Src-homology 3 (SH3) doménu na N-konci, dále doménu bohatou na prolin a substrátovou doménu. Substrátová doména je složena z 15 opakování YXXP fosforylačního motivu pro kinázy rodiny Src. Proteiny obsahující doménu Src-homology 2 (SH2) se vážou na fosforylované tyrosinové zbytky v této oblasti (Sakai et al., 1994). Za substrátovou doménou je doména bohatá na serinové zbytky, která tvoří svazek čtyř šroubovic (Briknarová et al., 2005). C-terminální doména obsahuje vazebná místa pro SH2 a SH3 domény Src. Tyr762 je vazebným místem pro SH2 doménu Src (sekvence YDYVHL), vazebná sekvence pro Src SH3 doménu je RPLPSPP (Nakamoto et al., 1996) (viz obrázek 1). V buňkách je p130Cas lokalizován v cytoplazmě a po aktivaci integrinových receptorů přechází do fokálních adhezí (FA) a dochází k fosforylaci p130Cas na tyrozinech v substrátové doméně. Fosforylace substrátové domény je jednou z důležitých událostí, které směřují k tvorbě membránových protruzí. Tyto struktury přispívají k buněčné motilitě (Fonseca et al., 2004).

p130Cas je nezbytnou součástí normálního vývoje. Myší embrya postrádající gen pro protein p130Cas umírají *in utero* kvůli defektům v kardiovaskulárním vývoji, dezorganizaci myofibril, narušené asociaci aktinových stresových vláken a zpomalení růstu. Fibroblasty s nedostatkem proteinu p130Cas obsahují krátké narušené aktinové filamenty a organizace aktinových stresových vláken je obnovena po ektopické expresi genu p130Cas. Tyto výsledky prokazují klíčovou roli proteinu p130Cas v regulaci aktinového cytoskeletu (Honda et al., 1998).

Oficiální název lidského orthologu p130Cas je BCAR1 (Breast Cancer Resistance 1). Sekvenční analýza lidské BCAR1 cDNA předpověděla protein s 870 aminokyselinami, který je vysoce homologní s potkaní variantou adaptorového proteinu p130Cas. Genomická analýza odhalila, že BCAR1 sestává ze sedmi exonů a nachází se na chromozomu 16q23.1 (Brinkman et al., 2000).

## Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je shrnout signální mechanismy, kterými substrátová doména proteinu p130Cas přispívá k migraci, invazivitě a metastázování nádorových buněk. Tato práce se zaměřuje na:

- 1) popis proteinu p130Cas, především jeho substrátové domény, a porovnání s ostatními členy rodiny proteinů CAS,
- 2) popis signálních drah, kterých se účastní substrátová doména proteinu p130Cas a které vedou k migraci a metastázování nádorových buněk, popis proteinů spojených s migrací buněk a popis a porovnání adhezí bohatých na aktin,
- 3) objasnění funkce proteinu p130Cas v normálních a patologických buněčných procesech, s důrazem na funkci substrátové domény.

# 1 Ostatní členové rodiny CAS

Druhým identifikovaným členem rodiny proteinů CAS je SIN (Src interacting/signal integrating protein), též známý jako EFS (Embryonal Fyn Substrate). Tento protein obsahuje prolin bohatou oblast, která se váže na SH3 doménu Src, a četné tyrozinové zbytky v konfiguracích naznačujících SH2-vazebná místa. Tyrozinové motivy se liší od těch, které se nacházejí na proteinu p130Cas. YDVP motiv interaguje s endogenním Crk *in vivo* a váže se na SH2 doménu Crk *in vitro*. SIN navíc obsahuje tyrozinový motiv YAAP, který není přítomen na p130Cas (Alexandropoulos and Baltimore, 1996) a který slouží jako vysokoafinitní ligand pro Abl kinázu (Songyang et al., 1995). Exprese genu SIN je vyšší v mozku, brzlíku a kosterních svalech (Alexandropoulos and Baltimore, 1996).

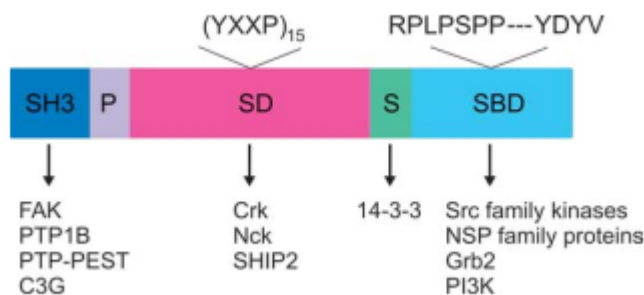
Třetí protein z rodiny CAS (známý alternativně jako HEF1, CASL, CAS-L, NEDD9, CAS2 a CASS2) byl identifikován během hledání lidských genů, které podporují filamentární růst v kvasinkách, s cílem identifikovat geny regulující buněčný cyklus a polaritu. Proteinová sekvence a struktura jsou velmi podobné s proteinem p130Cas. Oba proteiny mají N-terminální SH3 doménu, centrální doménu obsahující více potenciálních SH2 vazebných míst a C-terminální doménu. SH3 doména proteinu HEF1 může interagovat s dvěma oblastmi bohatými na prolin fokální adhezni kinázy (FAK). Na rozdíl od p130Cas se zdá, že exprese HEF1 je tkáňově specifická. Zatímco p130Cas je lokalizován převážně ve FA, imunofluorescence naznačuje, že HEF1 je lokalizován jak na periferii buněk, tak v buněčném jádru a je jinak lokalizován ve fibroblastech a epitelových buňkách (Law et al., 1996). Na rozdíl od HEF1 obsahuje p130Cas C-terminální oblast bohatou na prolin, která je vazebným motivem pro SH3 doménu Src (Nakamoto et al., 1996). Zvýšená exprese proteinu HEF1 je důležitá pro invazivitu *in vitro* a metastázování *in vivo* (Kim et al., 2006). Je velmi pravděpodobné, že posttranskripční události modulují expresi a působení HEF1 u agresivních typů rakovin. Fosforylace HEF1 je indukována např. kinázou Abl (Law et al., 1996).

Čtvrtý člen rodiny, HEPL (jako zkratka pro HEF1-EFS-P130Cas-like)/CAS4/CASS4, byl identifikován teprve v roce 2008 na základě rozsáhlé analýzy genomických a transkriptomových sekvencí, které potvrdily, že protein byl exprimován a vykazoval podobné chování jako ostatní zástupci CAS rodiny minimálně v některých typech buněk. Proteiny HEPL si zachovávají důležité funkční domény potřebné pro interakci s kinázou FAK, pro cílení do FA a pro regulaci migrace buněk a aktivaci FAK. Nadměrná exprese HEPL je dostatečná pro spuštění migrace buněk a aktivaci FAK. Exprese proteinu HEPL je v netransformovaných buňkách důležitá pro normální funkci hematopoetického systému a plic (Singh et al., 2008).

## 2 Struktura proteinu p130Cas

### 2.1 Strukturální vlastnosti

Struktura p130Cas naznačuje, že plní roli adaptorového proteinu. p130Cas se skládá z mnoha domén pro interakce protein-protein zahrnující N-terminální SH3 doménu. Dále motiv bohatý na prolin a vnitřní substrátovou doménu. Substrátová doména se skládá z 15 opakování YXXP motivu, hlavního místa tyrozinové fosforylace p130Cas. Proteiny obsahující SH2 doménu se vážou na tyto YXXP motivy poté, co jsou fosforylovány. Mezi takové proteiny patří adaptorové proteiny Crk (Sakai et al., 1994) a Nck (Schlaepfer et al., 1997). Za substrátovou doménou je doména bohatá na serin, která tvoří svazek čtyř šroubovic (Briknarová et al., 2005). C-konec proteinu lze rozdělit do dvou částí: Src vazebná doména (SBD) a CCH (C-terminální homologie rodiny CAS). SBD obsahuje vazebná místa pro SH2 a SH3 doménu (YDYVHL a RPLPSPP) kináz rodiny Src (viz obrázek 1). Mutace v sekvenci RPLPSPP nebo na Tyr762 (v sekvenci YDYVHL) způsobily významné snížení asociace proteinu p130Cas s proteinem Src, a žádná vazba nebyla detekována, když byly obě sekvence vymazány (Nakamoto et al., 1996).



**Obrázek 1: Strukturální organizace proteinu p130Cas a jeho vazební partneři** (Wisniewska et al., 2005)

p130Cas je signální molekula, která ve své struktuře obsahuje doménu SH3 a skupinu motivů pro vazbu domén SH2 (Sakai et al., 1994), doména SH3 se váže na FAK (Polte and Hanks, 1995). SH2 a SH3 jsou nekatalytické domény, které jsou konzervovány v řadě cytoplazmatických signálních proteinů. Jsou regulované receptorovými tyrozinkinázami. SH2 domény signalizačních proteinů vážou fosforylované tyroziny na polypeptidech, které se podílejí na normální signalizaci i buněčné transformaci. Fosforylace tyrozinu vyvolá vazbu SH2 domén, čímž je zprostředkována například tvorba heteromerních proteinových komplexů na nebo v blízkosti plazmatické membrány. \*(Koch et al., 1991). Každá SH2 doména se váže na specifické proteiny obsahující fosfotyrosin tak, že rozpoznají fosforylovaný tyrozinový zbytek v kontextu několika sousedních aminokyselin (Muller et al., 1992). Domény SH3 vážou sekvence bohaté na prolin.

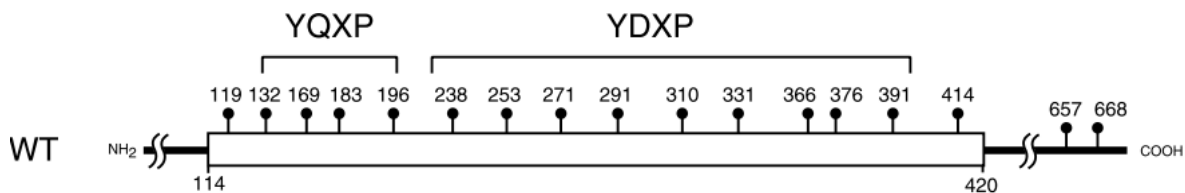
Byly identifikovány dvě třídy peptidových ligandů pro domény SH3: třída I se váže na konsenzuální sekvenci RXLPXP a třída II se váže na konsenzuální sekvenci XPPLPX (Feng et al., 1994).

Struktura p130Cas naznačuje, že se jedná o protein, který shromažďuje signály z různých signálních drah (Sakai et al., 1994). p130Cas interaguje *in vitro* s více proteiny obsahujícími SH2 doménu, alespoň jeden z těchto proteinů, Crk, se v buňkách váže na p130Cas v závislosti na adhezi (Vuori et al., 1996). Crk patří do rodiny proteinů, které sestávají téměř výhradně z domén SH2 a SH3, s malou intervenční sekvencí. Rodina Crk v současné době zahrnuje onkogenní v-Crk, dvě formy proteinů c-Crk, c-Crk I a c-Crk II. Široce exprimovaný protein c-Crk II, obsahuje N-terminální doménu SH2 následovanou dvěma doménami SH3 (Feller et al., 1994). Vznik komplexu p130Cas/Crk je kritický krok pro spuštění signálních událostí vedoucích k zvýšení aktinové dynamiky, včetně aktivace malé GTPasy Rac (Klemke et al., 1998).

## 2.2 Substrátová doména

p130Cas má na N-konci doménu SH3 a charakteristickou doménu bohatou na prolin. Poté následuje doména obsahující několik vzájemně podobných sekvencí, ve kterých se vždy vyskytuje tyrozin – 7 motivů YDVP a 2 YDTP obklopené 3 motivy YQVP, 1 YLVP, 1 YQAP a 1 YAVP. Tyto sekvence jsou vzájemně vzdálené 15-30 aminokyselin. Kombinace aminokyselinových sekvencí slouží jako substrát pro tyrozin kinázy, tato oblast je proto nazývána substrátovou. Většina těchto míst odpovídá konsenzuální sekvenci YDXP pro vazbu Crk (Sakai et al., 1994).

YXXP motivy na substrátové doméně proteinu p130Cas lze rozdělit na YDXP a YQXP (viz obrázek 2). Motiv YDXP jsou důležité pro organizaci aktinového cytoskeletu a migraci buněk, což naznačuje, že signalizace zprostředkovaná Crk reguluje tyto biologické procesy (Patwardhan et al., 2006).



**Obrázek 2: Substrátová doména p130Cas s motivy YDXP a YQXP (Patwardhan et al., 2006)**

Pomocí bodové mutační analýzy bylo ověřeno, že 10 tyrozinů v YXXP motivech 6-15 jsou hlavní oblastí, kde je p130Cas fosforylován pomocí kinázy Src (Shin et al., 2004). Fosforylace YXXP motivů 6-10 v substrátové doméně (Y238, Y253, Y271, Y291 a Y310) je důležitá pro progresi nádorů. V myším

modelu podporoval progresi nádoru fúzní protein Src\*/SD<sup>1</sup> (substrátová doména plné délky, stejně jako fragment substrátové domény obsahující motivy 6-10). Kompletní substrátová doména podporuje růst primárního nádoru a časnější nástup metastáz. Důležité je, že kompletní i zkrácená substrátová doména významně zvýšily výskyt metastáz do více orgánů. Tyto studie poskytují důkaz, že fosforylované motivy 6–10 v substrátové doméně (Y238, Y253, Y271, Y291 a Y310) jsou důležité pro progresi nádoru (Kumbrink et al., 2016). Zdá se, že motiv 9 (Y291) a 10 (Y310) má největší signalizační kapacitu, ovšem při vyřazení těchto dvou míst se stále Crk váže – to naznačuje příspěvek dalších YXXP skupin. Nicméně těchto hlavních deset motivů (6-15), kde je možná fosforylace na tyrozinu, jsou schopné podporovat signalizaci přes Crk. Crk se váže s nižší afinitou k motivům 11–15 než k motivům 6-10 (Shin et al., 2004). Fosforylace substrátové domény je nezbytná pro dynamické shlukování a rozpad FA (Machiyama et al., 2014).

### 3 Fosforylace

Bylo prokázáno, že mnoho růstových faktorů, hormonů, kináz/fosfatáz reguluje fosforylaci substrátové domény proteinu p130Cas (Bouton et al., 2001). p130Cas je lokalizován v cytoplazmě a po aktivaci integrinových receptorů přechází do FA, kde YXXP tyroziny substrátové domény podléhají fosforylaci (Fonseca et al., 2004). Fosforylace substrátové domény p130Cas po aktivaci integrinů reguluje reorganizaci aktinového cytoskeletu a souvisejících procesů, jako je migrace buněk (Honda et al., 1999).

#### 3.1 Různé typy fosforylace

##### 3.1.1 Tyrozinová fosforylace v transformovaných buňkách

p130Cas je hlavní na tyrozinu fosforylovaný protein, který pevně váže v-Crk v buňkách transformovaných v-*crk* a v-Src v buňkách transformovaných v-*src* (Sakai et al., 1994). Mutace ve v-Src a v-Crk, které zrušily vazbu těchto onkoproteinů s p130Cas, rovněž snížily jejich transformační aktivitu, což naznačuje, že p130Cas hraje důležitou roli v transformačním procesu zprostředkovaném těmito onkoproteiny (Kanner et al., 1991).

v-*crk*, transformující onkoprotein kódovaný virem ptačího sarkomu, je fúzní protein virového proteinu *gag* a domény SH2 a SH3 odvozené od c-Crk, buněčného protějšku v-Crk (Mayer et al., 1988). v-Crk má onkogenní potenciál a indukuje fosforylaci tyrozinu na několika různých proteinech, když je exprimován ve fibroblastech. Nejvýznamnějším tyrozinofosforylovaným proteinem z nich je p130Cas, který tvoří komplex s v-Crk (Birge et al., 1992). U buněčných transformací jinými aktivovanými onkogeny nebylo nalezeno žádné zvýšení hladiny fosforylace proteinu p130Cas, což naznačuje, že se mechanismy

---

<sup>1</sup> fúzní molekula Src\*/SD, kde je substrátová doména konstitutivně fosforylovaná

buněčné transformace různými onkogeny aspoň částečně liší (Sakai et al., 1994). Fosfoproteomické studie identifikovaly Tyr12 (Y12) lokalizovaný v SH3 doméně p130Cas jako nové místo fosforylace v Src transformovaných myších embryonálních fibroblastech (MEF) (Luo et al., 2008). Fosforylace Tyr12 v SH3 doméně p130Cas narušuje vazebnou funkci SH3. Blokování kapacity pro Tyr12 fosforylaci prostřednictvím fenylylaninové substituce vedlo k tomu, že buňky měly abnormálně velké FA a sníženou dynamiku FA a vykazovaly defekty v migraci jak ve dvojrozměrném, tak trojrozměrném prostředí. Navíc substituce Tyr12 glutamátem k napodobení negativního náboje fosfátové skupiny vedla ke zvýšené motilitě buněk (Janoštiak et al., 2011).

### 3.1.2 Tyrozinová fosforylace v netransformovaných buňkách

K fosforylaci tyrozinu dochází v důsledku rozmanité škály extracelulárních podnětů, například aktivací integrinových receptorů. Integriny zprostředkovaná adheze normálních fibroblastových buněčných linií stimuluje tyrozinovou fosforylaci p130Cas v těsné souvislosti s FAK fosforylací a tvorbou aktinových stresových vláken. Naproti tomu k extenzivní fosforylaci proteinu p130Cas nalezené v buňkách transformovaných *v-crk* a *v-src* došlo nezávisle na buněčné adhezi a následných změnách morfologie buněk (Nojima et al., 1995).

Ve FA je fosforylace p130Cas dosažena interakcemi s kinázami rodiny Src, c-Src primárně zprostředkovává na adhezi závislou p130Cas fosforylací (Hamasaki et al., 1996). Fosforylace substrátové domény p130Cas byla detekována převážně ve FA a na periférii buněk (Fonseca et al., 2004). Varianta proteinu p130Cas s fenylylaninovými substitucemi všech patnácti tyrozinů v substrátové doméně se stále lokalizuje do FA, což naznačuje, že tyrozinová fosforylace substrátové domény není nutná pro lokalizaci do FA (Cunningham-Edmondson and Hanks, 2009).

Na proteinu p130Cas byla tyrozinová fosforylace identifikována ve dvou oblastech. Prvním místem fosforylace je substrátová doména proteinu p130Cas, která je charakterizována 15 YXXP motivy. Tyrozinové zbytky jsou hlavním cílem fosforylace proteinu p130Cas, kterou má na starosti Src nebo příbuzné kinázy rodiny Src (Vuori et al., 1996). Tyrozinové zbytky v motivech YXXP substrátové domény po fosforylaci příslušnou kinázou slouží jako ligandy pro domény SH2 jiných buněčných proteinů, včetně proteinu Crk (Sakai et al., 1994) a proteinu Nck (Schlaepfer et al., 1997). C-terminální doména p130Cas představuje druhé místo tyrozinové fosforylace tohoto proteinu a je zodpovědné za interakci s kinázami rodiny Src (Nakamoto et al., 1996). Vazba Crk adaptorových proteinů na fosforylovaná YXXP místa znamená klíčový další krok v následných signalizačních událostech (Klemke et al., 1998) jako je např. sestavení komplexu p130Cas/Crk/DOCK180 v adhezních místech (Kiyokawa et al., 1998b). Tvorba tohoto molekulárního lešení pohání lokalizovanou aktivaci Rac ve FA a spouští migraci buněk (Kiyokawa et al., 1998a).

### 3.1.3 Procesivní fosforylace

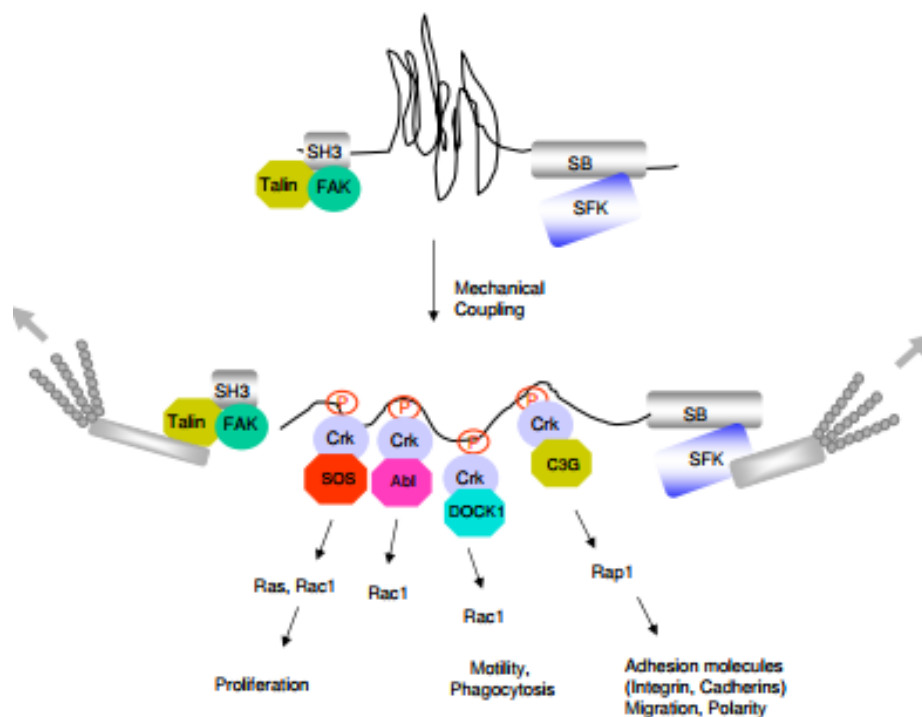
Na základě neobvyklého uspořádání opakujících se motivů YXXP přetrvával zájem, proč byl tento motiv 15krát duplikován \*(Birge et al., 2009).

K procesivní fosforylaci kinázami rodiny Src dochází tak, že fosforylace substrátu katalytickou doménou vytvoří místo, které je rozpoznáno přidruženou SH2 (nekatalytickou) doménou. Vazba na SH2 doménu zvyšuje lokální koncentraci substrátu, což umožňuje katalytické doméně fosforylovat další místa. Interakce mezi tímto místem a SH2 doménou kinázy usnadňuje fosforylaci následných tyrozinů v substrátu (Pellicena et al., 1998). Bylo navrženo několik proteinů, které jsou procesivně fosforylované nereceptorovými tyrozinkinázami. Jedním takovým proteinem je protein p130Cas. Tento protein má vazebné místo pro SH2 doménu proteinu Src poblíž svého C-konce (Nakamoto et al., 1996).

Fosforylace p130Cas pomocí Src by v zásadě mohla probíhat buď procesivním, nebo neprocesivním (distribučním) mechanismem. V procesivním mechanismu by Src zůstal vázán na svůj substrát, dokud nedokončí všechny fosforylace, a proto by bylo vyžadováno pouze jedno nasednutí kinázy Src na substrát. V případě neprocesivního mechanismu by se Src disocioval ze svého substrátu po každé fosforylační události. Protože p130Cas obsahuje 15 potenciálních fosforylačních míst v substrátové doméně, procesivní mechanismus by udělil reakci rychlost a účinnost (Scott and Miller, 2000). Primární rozpoznávací motiv zapojený do tvorby komplexu Src/p130Cas je C-terminální polyprolinový motiv proteinu p130Cas, tato oblast ukotvuje protein p130Cas ke kináze Src, což umožňuje účinnější fosforylaci p130Cas (Pellicena and Miller, 2001).

Novější studie (z roku 2009) naznačují, že fosforylace p130Cas je stochastická. Mutanty proteinu p130Cas, které obsahují jednu nebo více mutací motivu YXXP byly fosforylovány procesivně pomocí Src, což naznačuje, že jednotlivá místa jsou postradatelná a nezdá se, že by fosforylace následovala v závazném pořadí. Tyrozinové zbytky substrátové domény p130Cas nejsou kineticky rozlišitelné a kterákoli skupina tyrozinů přítomných v substrátové oblasti je dostatečná pro fosforylaci Src (Patwardhan et al., 2006). Pokud je několik tyrozinů v motivech YXXP je současně fosforylováno v kterémkoli daném okamžiku, mohly by oddělené molekulární komplexy p130Cas/Crk/DOCK180, p130Cas/Crk/C3G, p130Cas/Crk/JNK a p130Cas/Crk/PI3K existovat současně \*(Birge et al., 2009) (viz obrázek 3).





**Obrázek 3: Model signalizace přes substrátovou doménu proteinu p130Cas \*(Birge et al., 2009)**

### 3.1.4 Serin/threoninová fosforylace

Při mitóze se FA rozkládají a signální transdukce z FA je deaktivována. Složky FA včetně FAK, paxilinu a p130Cas jsou fosforylovány na serin/threoninových zbytcích během mitózy, když jsou všechny tři proteiny defosforylovány na tyrozinech. Fosforylace na serinových a threoninových zbytcích, specifická pro mitózu je odpovědná za narušení vazby FAK/p130Cas. Defosforylace může udržovat FAK v neaktivním stavu až do post-mitotického šíření (Yamakita et al., 1999). Po cytokinezi a ukončení mitotického dělení je serin/threoninová fosforylace odstraněna, pravděpodobně prostřednictvím protein-fosfatázy 2A (PP2A), a fosforylace na tyrozinu je obnovena (Yokoyama and Miller, 2001). Jediná zatím prokázaná kináza zodpovědná za fosforylaci p130Cas je protein kináza N3 (PKN3), která jej fosforyluje na Ser428. PKN3 se váže na SH3 doménu proteinu p130Cas svou doménou bohatou na prolin (PPKPPRL) (Gemperle et al., 2019).

## 3.2 Defosforylace

SH3 doména p130Cas také interaguje s tyrozin fosfatázami PTP-1B (Liu et al., 1996) a PTP-PEST (Garton et al., 1997), což naznačuje možnou roli této domény v pozitivní i negativní regulaci fosforylace tyrozinových zbytků na substrátové doméně p130Cas (Brábek et al., 2005).

### 3.3 Fokální adheze

Proces buněčné migrace je funkčně spojen s interakcí buňka-extracelulární matrix (ECM). První náznak, že protein p130Cas hraje roli v tomto procesu, vyšel ze studií prokazujících, že byl protein p130Cas přítomen v subcelulárních strukturách nazývaných fokální adheze (FA), které tvoří molekulární mosty mezi ECM a aktinovým cytoskeletem \*(Bouton et al., 2001). FA se skládají z cytoplazmatické části, obsahující cytoskeletální prvky, transmembránové spojovací oblasti a extracelulární části, která je složena z proteinů ECM \*(Jockusch et al., 1995). p130Cas je součástí FA během jejich skládání i rozkládání. Tyto procesy musí být pevně regulovány, aby umožnily účinnou pohyblivost buněk (Donato et al., 2010).

Pro stanovení subcelulární lokalizace p130Cas bylo současně provedeno imunofluorescenční značení pomocí dvou p130Cas specifických polyklonálních antisér. Aby se potvrdilo, že p130Cas je lokalizován do FA, bylo provedeno barvení pomocí monoklonální protilátky proti vinculinu, jedné ze složek FA. Barvení p130Cas oběma zvolenými protilátkami bylo lokalizováno na stejném místě, jako barvení vinculinu, tedy v místech FA (Harte et al., 1996). SH3 doména p130Cas vytvořila stabilní komplex s hlavním tyrozinofosforylovaným proteinem přítomným v lyzátech CE buněk (chicken embryo cells) (Harte et al., 1996) Tento protein byl dříve identifikován jako FAK, tyrozinkináza přítomná ve FA (Schaller et al., 1992). SH3 doména p130Cas byla schopna vytvořit stabilní komplex s kinázou FAK *in vitro*. Ostatní domény proteinu p130Cas s FAK neinteragovaly. Vazba p130Cas na FAK je přímá, není zprostředkována jinými proteiny. Interakce p130Cas FAK byla potvrzena třemi pozorováními; kolokalizace p130Cas FAK do stejného buněčného kompartmentu, izolace stabilních komplexů p130Cas a FAK z buněk exprimujících FAK a schopnost rekonstituovat interakci FAK a p130Cas *in vitro* (Harte et al., 1996). Pro vazbu p130Cas do FA je potřeba nejen FAK, ale i protein vinkulin, který s p130Cas interaguje. Tato interakce je zprostředkována SH3 doménou p130Cas a doménou bohatou na prolin proteinu vinkulin (konkrétně motiv PKPP) (Janošiak et al., 2014a). Kromě SH3 domény p130Cas je nezbytná pro správnou lokalizaci do FA i jeho CCH doména (Donato et al., 2010).

#### 3.3.1 Fokální adhezní kináza

FAK se skládá z N-konce, který obsahuje FERM doménu (band 4.1, ezrin, radixin, moesin homology), dále z centrální kinázové domény a C-terminální FAT domény (focal adhesion targeting) \*(Lim et al., 2008). FAK obsahuje několik tyrozinových fosforylačních míst, které jsou klíčové pro signalizaci FAK (Calalb et al., 1995). FAT doména nepřímě spojuje FAK s integriny a FA prostřednictvím proteinů jako je např. paxilin (Schaller and Parsons, 1995).

## 4 Mechanosensing

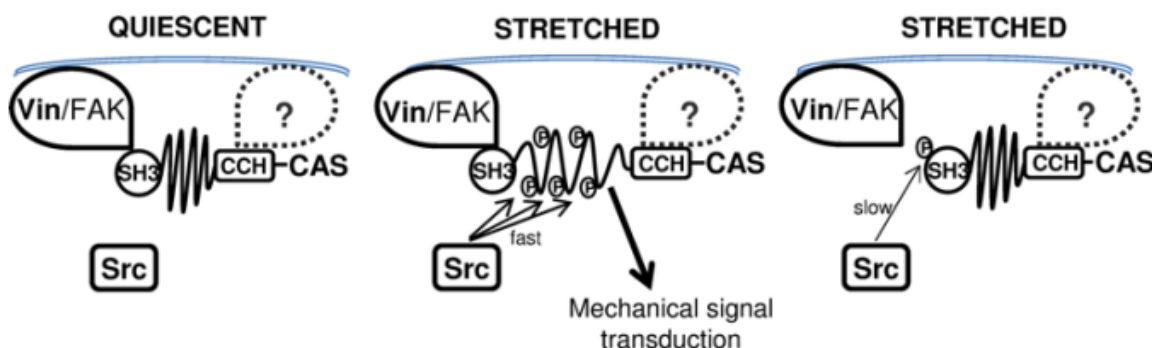
Buněčný mechanosensing lze popsat jako schopnost buněk vnímat fyzické síly přenášené okolní extracelulární maticí nebo sousedními buňkami. Buňky testují vlastnosti svého prostředí pomocí různých skupin mechanosenzorických proteinů a buněčných struktur. Mechanosenzory používají modifikace a konformační změny vyvolané silou a převádějí fyzické podněty na biochemickou signalizaci, které přenášejí informace o prostředí buňky do vnitřku buňky \*(Janoštiak et al., 2014b).

Natažení buněk by mohlo zvýšit fosforylaci tyrozinu několika možnými způsoby: 1) přímou aktivací kinázy, 2) inaktivací fosfatázy, 3) mechanickým přenesením kinázy na substrát nebo 4) zvýšením náchylnosti substrátu k fosforylaci. Protein p130Cas byl poprvé označen jako potenciální mechanosensor, který reaguje na tuhost, napětí a protažení ECM, v roce 2006 (Sawada et al., 2006). C- a N-terminální domény jsou zapojeny do lokalizace p130Cas do FA, zatímco samotná substrátová doména není (Nakamoto et al., 1997), což naznačuje, že tyto hraniční domény ukotvují molekuly p130Cas k cytoskeletálnímu komplexu a že substrátová doména by mohla být prodloužena po protažení cytoskeletu. Bylo dokázáno, že substrátová doména p130Cas je fosforylována v reakci na mechanické natažení *in vivo* i *in vitro*. Po mechanickém roztažení se substrátová doména p130Cas odhalí a odkryje kryptické tyroziny, které jsou následně fosforylovány kinázami Src a Abl, což umožňuje přeměnu vnější síly na intracelulární biochemické signály (Sawada et al., 2006). Mechanické roztažení, které buňkám umožňuje cítit a reagovat na mechanické síly, zvyšuje tyrozinovou fosforylaci p130Cas a její spojení s proteinem Crk, což vede k aktivaci malé GTPasy Rap1, a je důležité pro zahájení signální dráhy Crk/C3G/Rap1 (Tamada et al., 2004). Rap1 je aktivován různými typy GEF (guanine nucleotide exchange factors) spojených s různými receptory nebo druhými posly a hraje důležitou roli v řadě signálních drah včetně integrinové signalizace \*(Hattori and Minato, 2003).

Pro umístění p130Cas do správné polohy do FA je vyžadována přímá vazba SH3 domény p130Cas s FAK nebo vinculinem a CCH domény s dosud nezjištěným proteinem FA. Schopnost p130Cas působit jako mechanosenzor tedy není způsobena pouze fosforylačním stavem jeho substrátové domény, ale také spojením SH3 a CCH domény s FA proteiny (Janoštiak et al., 2014a, 2011).

Pro správnou mechanotransdukcí musí tedy být p130Cas ukotven na nejméně dvou vzdálených stranách molekuly k jiným proteinům přenášejícím sílu. Vinculin je jedním z hlavních proteinů přenášejících sílu ve FA (Mierke et al., 2008) a pro mechanickou stresem zprostředkovanou fosforylaci substrátové domény p130Cas je nutná přímá interakce p130Cas s vinculinem (Janoštiak et al., 2014a). Role p130Cas v mechanosensingu je závislá na tuhosti ECM. p130Cas mění tvorbu FA a lokalizuje se do FA pouze tehdy, když je tuhost extracelulární matrice větší než prahová hodnota 47 kPa. Lokalizace p130Cas

do FA předcházela vytváření trakční síly o ~ 3 minuty. Zdá se tedy pravděpodobné, že po lokalizaci do FA je p130Cas aktivován silou, což vede k fosforylačním událostem, které přenášejí mechanické signály na biochemické (Hoorn et al., 2018).



**Obrázek 4: Model pro regulaci p130Cas-závislého mechanosensingu** (Janoštiak et al., 2014a)

Mechanotransdukce zprostředkovaná proteinem p130Cas vyžaduje fosforylaci substrátové domény p130Cas pomocí Src (Sawada et al., 2006). Současně však Src fosforyluje p130Cas i na tyrozinu 12 a inhibuje tak vazbu p130Cas nejen na FAK a PTP-PEST (Janoštiak et al., 2011), ale také na vinculin (Janoštiak et al., 2014a). Fosforylace p130Cas na tyrozinu 12 pomocí Src tedy inhibuje vazbu na vinculin a FAK a tím může zabránit mechanickému natažení substrátové domény p130Cas. Toto naznačuje možnost, že Src iniciuje i ukončuje mechanotransdukci zprostředkovanou proteinem p130Cas negativní zpětnou vazbou (Janoštiak et al., 2014a). Fosforylace tyrozinů v substrátové doméně p130Cas a fosforylace tyrozinu 12 vykazují výrazně odlišnou dynamiku. Mechanické roztažení buňky je přenášeno ve FA do substrátové domény p130Cas, která se fyzicky natahuje a je fosforylována pomocí Src. Po fosforylaci tyrozinu 12, který je fosforylován s pomalejší dynamikou, a následné disociaci komplexu p130Cas/vinculin/FAK se uvolní kotvení k FA zprostředkované SH3 doménou p130Cas a vrátí substrátovou doménu do neroztaženého stavu (Janoštiak et al., 2014a) (viz obrázek 4).

Jednou tkání, která je silně vystavena mechanickému stresu, je kosterní sval. Svalová specifická delece p130Cas však nezměnila adaptaci kosterního svalu vyvolanou protahováním nebo během, což naznačuje, že *in vivo* nepřítomnost p130Cas může být kompenzována jinými mechanosensory nebo zapojením jiných členů rodiny CAS (Akimoto et al., 2013).

Jaderný faktor kB (NF-kB) je transkripční faktor, který hraje úlohu při regulaci zánětu a stárnutí (López-Otín et al., 2013). Protože NF-kB je také exprimován všudypřítomně a existují důkazy, že reaguje na mechanické stimulace (Orr et al., 2005) začalo se spekulovat, že by protein p130Cas mohl interagovat

s NF-kB při mechanické regulaci homeostázy organismu v souvislosti se zánětem a stárnutím. p130Cas je distribuován v jádře a podporuje homeostázu kosterní tkáně řízenou mechanickým napětím a zmírňuje aktivitu NF-kB, která by jinak vedla k zánětlivým procesům. Změna mechanického napětí moduluje distribuci proteinu p130Cas a aktivitu NF-kB v osteocytech, což jsou mechanosenzorické buňky v kostech. Při nepřítomnosti proteinu p130Cas v osteocytech je zvýšena kostní resorpce, která vede k onemocnění osteopenie. Interakce p130Cas/NF-kB v osteocytech by se tedy mohla podílet na mechanické regulaci homeostázy kostí (Miyazaki et al., 2019).

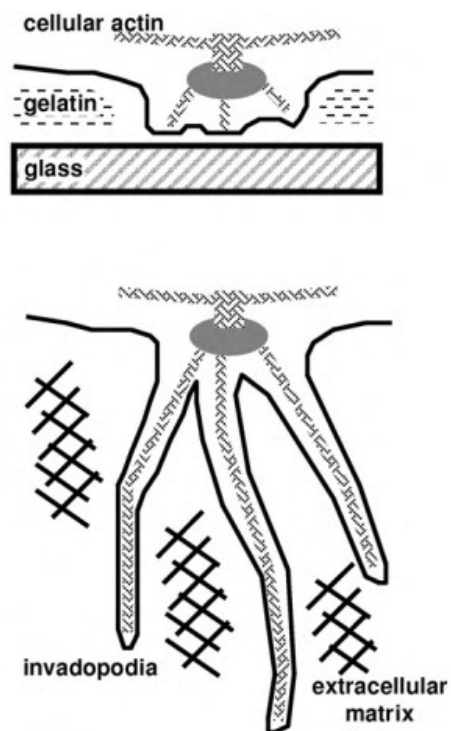
## 5 Signalizace vedoucí k migraci buněk

### 5.1 Migrace

Počátečním krokem procesu migrace a invaze nádorových buněk je vytvoření buněčných výčnělků ve směru pohybu buněk (Friedl and Wolf, 2003). Tvorba těchto buněčných výčnělků je řízena aktinovou polymerizací na přední hraně migrujících buněk (Pollard and Borisy, 2003). Zapojení p130Cas do buněčné migrace závisí hlavně na jeho tyrozinové fosforylaci pomocí Src (Vuori et al., 1996) a často na sestavení komplexu p130Cas/Crk/DOCK180 v místech adheze buněk (Kiyokawa et al., 1998b). Pravděpodobný mechanismus, kterým tyroziny v motivu YXXP substrátové domény proteinu p130Cas podporují invazivní/metastatické chování, je prostřednictvím aktivace signalizačních událostí vedoucích k sestavení podosomů (Brábek et al., 2005). Mnoho invazivních rakovinných buněk vytváří struktury podobné podosomům, zvané invadopodia, které představují hlavní místa degradace ECM v těchto buňkách. Současnou konvencí je použití termínu podosom pro struktury nalezené v normálních buňkách (jako jsou monocytární buňky, endoteliální buňky a buňky hladkého svalstva) a ve fibroblastech transformovaných Src (Gimona et al., 2008). Invadopodia jsou membránové výstupky schopné degradace ECM vytvořené invazivními rakovinnými buňkami (Chen, 1989).

ECM má signální i strukturální roli v tkáních. Ve většině případů ECM funguje jako překážka pohybu rakovinných buněk a degradace pomocí invadopodií představuje důležitý mechanismus pro překonání těchto překážek. Hustší želatinové substráty vedly v experimentálních uspořádáních *in vitro* ke zvýšení počtu invadopodií a jejich schopnosti degradovat ECM (Alexander et al., 2008). Bylo také pozorováno, že minimálně některé nádorové linie jsou schopné degradovat matrix nejen pomocí invadopodií, ale také v místech FA. Degradace matrix v místech FA je zprostředkována MT1-MMP, MT1-MMP je zacílen do FA interakcí s komplexem FAK/p130Cas. Vytvoření komplexu FAK/p130Cas/MT1 je nezbytné pro degradaci ECM soustředěnou na FA a pro invazivní migraci nádorových buněk přes Matrigel, tato studie je ovšem jediná svého druhu (Wang and McNiven, 2012).

Yamaguchi et al provedli časosběrnou analýzu tvorby invadopodií. Tato analýza odhalila, že existují významné rozdíly mezi podosomy a invadopodii, pokud jde o jejich dynamiku: invadopodie se tvoří hlavně de novo na periferii buněk, mají životnost měnící se od několika minut do hodin a jsou to pohyblivé struktury (Yamaguchi et al., 2005).



Protože obě struktury byly studovány většinou na tenkých matricích, jejich běžně uváděné tvary a vlastnosti se mohou lišit od těch *in vivo*. Pro hodnocení morfologie invadopodií ve složitém 3D prostředí byla pozorována tvorba invadopodií v buňkách pěstovaných na husté matrici v bezbuněčné dermis. Nejvýraznějším rozdílem mezi invadopodii vytvořenými v tenkých matricích a těmi v 3D prostředí, je přítomnost tenkých filopodií podobných struktur. Tenké výstupky se také vytvářejí v tenkých matricích, jejich růst je zastaven neproniknutelným povrchem krycího sklíčka. V důsledku toho jsou pozorovány pouze základní struktury invadopodií, které lze považovat za experimentální artefakt (Tolde et al., 2010) (viz obrázek 5).

**Obrázek 5: Růst invadopodií v různém prostředí** (Tolde et al., 2010)

## 5.2 Dráha p130Cas-SD/Crk/DOCK 180/Rac vedoucí k tvorbě lamelipodií

Integriny jsou transmembránové receptory, které zprostředkovávají připojení buněk k proteinům ECM ve FA \*(Jockusch et al., 1995). Jedním typem signální události stimulované integriny je tyrozinová fosforylace signálních proteinů. Protože integriny nemají vlastní katalytickou aktivitu, signály iniciované interakcemi ECM-integrin jsou přenášeny do buněk prostřednictvím aktivace proteinů spojených s integriny, jako jsou např. protein tyrozin kinázy \*(Guo and Giancotti, 2004). Signalizace zahrnuje řadu po sobě jdoucích fosforylačních událostí, přičemž jednou z prvních událostí je autofosforylace FAK na Tyr397 a vytvoření vazebného místa pro kinázy rodiny Src. Mutace Tyr397 na Phe inhibuje tvorbu stabilních komplexů se Src (Schaller et al., 1994). Src se váže na FAK přes svou SH2 doménu, mutant FAK, který není autofosforylovaný, neinteraguje s SH2 doménou Src (Xing et al., 1994). Dalším důležitým krokem v signální dráze je fosforylace tyrozinových zbytků (407, 576 a 577) na FAK pomocí kinázy Src (Calalb et al., 1995). Fosforylace substrátové domény p130Cas je nejefektivněji dosaženo kooperativním mechanismem, přičemž p130Cas navázaný přes svou SH3 doménu na FAK je fosforylován

Src navázaným na pTyr397 FAK. FAK zde hraje roli lešení, které působí tak, že přibližuje Src k jeho substrátu p130Cas (Ruest et al., 2001). Crk se poté váže na fosforylované tyroziny proteinu p130Cas, který indukuje aktivitu proteinu Rac (Klemke et al., 1998).

Vazba adaptorového proteinu p130Cas a Crk představuje zásadní proces signální dráhy, která indukuje invazi buněk a chrání buňky před apoptózou. Aktivita proteinu Rac je důležitou složkou nezbytnou pro p130Cas/Crk zprostředkovanou invazivitu. Invazivita buněk je spojena se schopností Rac organizovat aktinový cytoskelet a regulovat změny tvaru buněk nezbytné pro migraci a přežití v reakci na ECM proteiny. Odpojení proteinu p130Cas od proteinu Crk zabraňuje migraci a indukuje apoptózu invazivních buněk (Cho and Klemke, 2000).

### 5.2.1 Crk

Crk představuje třídu adaptorových proteinů sestávajících se převážně z SH2 a SH3 domén. Může se současně vázat na proteiny fosforylované na tyrozinu prostřednictvím své SH2 domény a na proliny bohaté signální molekuly prostřednictvím SH3 domén \*(Pawson, 1995). SH3 doména Crk se může vázat na různé molekuly, včetně guaninových nukleotidových výměnných proteinů, C3G (Tanaka et al., 1994) a také na protein DOCK (Hasegawa et al., 1996). Gen *c-crk* kóduje tři alternativně sestřihané produkty translace: c-CrkI, c-CrkII (Matsuda et al., 1992). c-Crk I se skládá z jedné SH2 domény a jedné SH3 domény. Delší protein Crk, c-Crk II (dále jen Crk), má velikost 38–42 kDa - v závislosti na analyzovaném druhu - a obsahuje další SH3 doménu plus spojovací oblast přibližně 50 aminokyselin mezi SH3 doménami (Reichman et al., 1992) (viz obrázek 6).

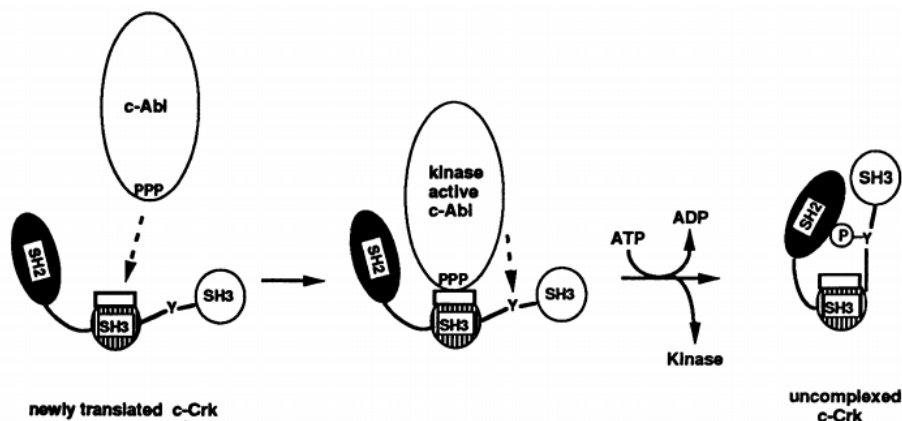


**Obrázek 6: Srovnání c-CrkII a c-Crk-I** (Feller et al., 1998)

Crk interaguje s řadou proteinů prostřednictvím své první SH3 domény (označeno v obrázku 5 číslem 1), mezi tyto proteiny patří např. Abl (Feller et al., 1994a). Nereceptorová tyrozinkináza Abl je klíčovým regulátorem vazby p130Cas na Crk, způsobuje inhibiční fosforylaci Crk na Tyr221 a následný rozpad proteinového komplexu (Kain and Klemke, 2001).

Abl kinázy jsou aktivovány jako odezva na stimulaci integriny a cytokiny, které negativní zpětnou vazbou regulují množství komplexů Crk/p130Cas a signálů, které regulují aktinový cytoskelet. Důležitou součástí této signální dráhy je schopnost Abl se asociovat s Crk a fosforylovat ho na tyrozinu 221. Jakmile je fosforylovaný, tyrozin 221 proteinu Crk tvoří intramolekulární můstek s vlastní SH2 doménou, čímž

brání interakci se svými vazebnými partnery a tím i přenosu signálu přes protein Crk (Feller et al., 1994a) (viz obrázek 7). Naopak defosforylace Crk-Y221 pomocí PTP-1B podporuje zvýšenou vazbu Crk/p130Cas a migraci buněk (Takino et al., 2003).



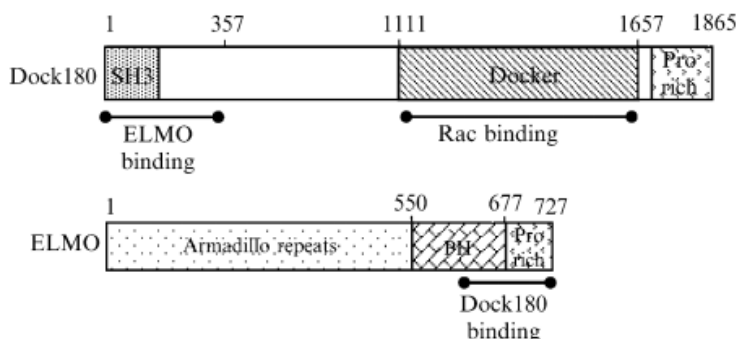
**Obrázek 7: Model regulace vazebné aktivity proteinů Abl a Crk (Feller et al., 1994a)**

Pro signalizaci vedoucí k aktivaci Rac a zvýšené dynamice aktinového cytoskeletu nezbytnou pro pohyblivost buněk je důležitá fosforylace proteinu Crk. Fosforylace tyrozinu 221 na Crk způsobí translokaci proteinů Crk a Rac z cytoplasmy na membránu (Abassi and Vuori, 2002). Zde je Crk rychle defosforylován fosfatázou PTP-1B (Takino et al., 2003). Defosforylovaný Crk je poté k dispozici pro vazbu k efektorovým proteinům (Abassi and Vuori, 2002). Jedním z efektorových proteinů je p130Cas, který se váže přes svou substrátovou doménu na SH2 doménu proteinu Crk (Klemke et al., 1998). p130Cas je lokalizován do FA (Nakamoto et al., 1997) a je fosforylován na tyrozinech při integrinové stimulaci (Nojima et al., 1995). Fosforylace proteinu p130Cas rekrutuje Crk do FA (Vuori et al., 1996).

Ukázalo se, že Crk rekrutuje protein DOCK180 do FA (Kiyokawa et al., 1998b). Sestavení komplexu p130Cas/Crk/DOCK180 ve FA řídí aktivitu proteinu Rac, což vede k polymerizaci aktinu a vazbě vysoce afinitních integrinových receptorů nezbytných pro tvorbu lamelipodií a buněčnou migraci (Kiosses et al., 2001). DOCK180 se váže na Rac, který nemá navázaný žádný guaninový nukleotid, což je meziprodukt během guaninové nukleotidové výměny katalyzované GEF (Kiyokawa et al., 1998a). DOCK180 nedisponuje typickou DH doménou, konzervovanou doménou v rámci členů nadrodiny DOCK180, ale má „Docker“ doménu. Tato doména specificky rozeznává Rac ve stavu bez nukleotidů a je nezbytná pro navázání GTP na Rac *in vitro*. V buňkách je vazba DOCK180 na samotný Rac nedostatečná pro navázání GTP a je nutná interakce DOCK180 s ELMO1 (Brugnera et al., 2002).



Proteiny z rodiny Dock180 se váží na další evolučně konzervovaný protein ELMO, a následně dochází k aktivaci Rac GTPázy. ELMO moduluje aktivaci Rac pomocí DOCK180 několika odlišnými mechanismy: pomáhá DOCK180 stabilizovat Rac v přechodném stavu bez nukleotidů a směřuje DOCK180 na plazmatickou membránu, aby se získal přístup k Rac (Lu and Ravichandran, 2006). CED12 a jeho savčí orthology ELMO1 a ELMO2 spolupracují s Crk a DOCK180, vznik tohoto komplexu je nezbytný pro aktivaci malé GTPázy Rac (Gumienny et al., 2001).



**Obrázek 8: Schematická organizace domén proteinů DOCK180 a ELMO (není nakreslena v měřítku)** (Lu and Ravichandran, 2006)

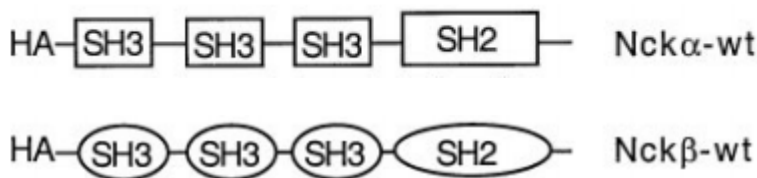
Přímá interakce zahrnuje C-terminální oblast ELMO1 a N-terminální oblast DOCK180 (viz obrázek 8). Minimální fragment ELMO schopný interagovat s DOCK zahrnuje PH oblast a její dvě okrajová  $\alpha$ -helixová rozšíření. 3D struktura potvrdila, že oba  $\alpha$ -helixy, které lemují PH doménu ELMO, a  $\alpha$ -helikální svazek DOCK jsou zapojeny do vazby (Komander et al., 2008). Dále bylo zjištěno, že SH3 doména DOCK180 významně interaguje s ELMO1. C-terminální konec ELMO, obsahující  $\alpha$ -helix C $\alpha$ h a PXXP motiv, přispívá k afinitě ELMO1 pro SH3 doménu DOCK180 (Sévajol et al., 2012).

Malé GTP-vazebné proteiny Rac1 a Rac2 jsou navzájem 92% homologní a patří do Rho podrodiny proteinů souvisejících s Ras (Didsbury et al., 1989). Rac v signální dráze působí až po vzniku komplexu Crk/DOCK180 proteinů během vývojových procesů, které zahrnují např. migraci buněk (Nolan et al., 1998). Rac stimuluje novou polymerizaci aktinu pomocí stimulace komplexu Arp2/3, který iniciuje tvorbu nových aktinových filamentů ze stran existujících filamentů a vytváří tak větvené sítě aktinových filamentů (Pollard et al., 2000). Samotný komplex Arp 2/3 je neaktivní a závisí na vnějších aktivátorech. První známý aktivátor komplexu Arp2/3 byl ActA (Welch et al., 1998). Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP), a jeho příbuzný Scar1/WAVE jsou proteiny, které interagují s komplexem Arp2/3. Pomocí deleční analýzy ukázali, že jak WASP, tak Scar1/WAVE interagují s p21 podjednotkou komplexu Arp2/3 prostřednictvím svých C-konců (Machesky and Insall, 1998) a tyto C-terminální domény jsou nezbytné pro

zahájení nukleace aktinových filament (Machesky et al., 1999). Aktivace Rac má za následek vytvoření širokých „listovitých“ protruzí z okraje buněk známých jako lamelipodia (Ridley et al., 1992).

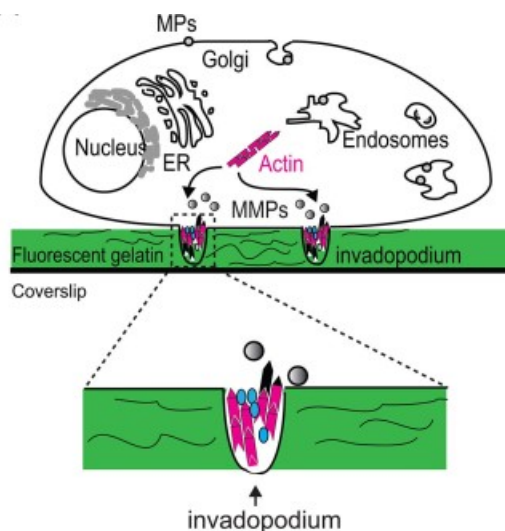
### 5.3 Protein Nck

Tyrozínová fosforylace YXXP míst na substrátové doméně proteinu p130Cas dovoluje navázání signálních molekul, které ve své struktuře obsahují SH2 domény. Tuto podmínku splňuje kromě proteinu Crk i protein Nck (Chou et al., 1992). Savci mají dva členy rodiny Nck (Nck1/alfa a Nck2/beta) (Chen et al., 1998) (viz obrázek 9). Proteiny Nck přispívají k regulaci aktinového cytoskeletu, aktivují N-WASP navázáním svých SH3 domén na doménu N-WASP bohatou na prolin (Rohatgi et al., 2001). Proteiny Nck1 a Nck2 se funkcí vzájemně překrývají a jsou zásadní pro správný embryonální vývoj. Myši deficientní na Nck1 nebo Nck2 jsou životaschopné, zatímco inaktivace obou proteinů Nck1 i Nck2 vede k závažným defektům při tvorbě lamelipodií a migraci buněk, vede také k embryonální letalitě (Bladt et al., 2003).



**Obrázek 9: Struktura proteinů Nck** (Chen et al., 1998)

Nck1 byl identifikován jako specifický marker invadopodií, ale nikoli podosomů. Prostorové rozmístění proteinů Nck1 a Grb2 je unikátní pro každou ze struktur, odpovědných za odbourávání mezibuněčné hmoty, lokalizovaných na ventrální straně buněk (Oser et al., 2011). Na rozdíl od představy, že proteiny Nck jsou nezbytnými regulátory funkce invadopodií, zůstává jejich role v biogenezi podosomů většinou neurčená (Chaki et al., 2019). Adaptorové proteiny Nck indukují biogenezi podosomů v endoteliálních buňkách. Ektopická exprese Nck indukuje tvorbu podosomů v endoteliálních buňkách, které je bez stimulace *in vitro* nemají (Chaki et al., 2019). Kromě role v biogenezi podosomů je protein Nck nutný pro růst a vaskularizaci primárních nádorů a plicních metastáz u rakoviny prsu. Urychluje invazi buněk karcinomu prsu regulací dynamiky aktinových filament v invadopodiích a řídí dodávání a akumulaci MMP14 na buněčném povrchu, čímž způsobuje proteolýzu proteinů ECM (Morris et al., 2017) (viz obrázek 10).



**Obrázek 10:** Aktinová remodelace v závislosti na proteinu Nck zprostředkovává cílené dodávání matrixových metaloproteináz (MMP), aby umožnilo degradaci proteinů ECM (Morris et al., 2017)

## 5.4 p130Cas-SH3/Zyxin/CIZ/MMP

Exprese MMP je důležitým aspektem invaze, protože degradace ECM umožňuje invazi rakovinných buněk do okolních tkání. p130Cas se podílí na regulaci transkripce MMP prostřednictvím interakce s proteinem CIZ. Tento protein se váže na CCTTTTCAAAAAGA sekvenci lidského MMP-1 promotoru a posiluje transkripci z promotorů MMP-1, MMP-3 a MMP-7. CIZ se obvykle nachází v jádře a je rekrutován z jádra, když buňky vytvářejí stabilní FA a stresová vlákna (Nakamoto et al., 2000). Interakce proteinu p130Cas a CIZ je zprostředkována proteinem zyxin (Janssen and Marynen, 2006). Nedávná studie naznačila, že zyxin může působit prostřednictvím mitotické fosforylace, kdy je protein zyxin fosforylován pomocí cyklin-dependentní kinázy 1. Fosforylace působí jako spouštěč aktivity zyxinu, ten tak podporuje růst a proliferaci rakovinných buněk (Zhou et al., 2018).

## 5.5 p130Cas-SD/Crk/JNK/MMP2/9

Bylo zjištěno, že exprese p130Cas významně zvyšuje invazivitu buněk transformovaných Src. Zvýšená invazivita byla spojena se zvýšenou aktivací matrixové metaloproteinázy-2 (MMP-2) a tvorbou podosomálních agregátů bohatých na aktin (Brábek et al., 2004). Endogenní molekula Crk má fyziologickou roli ve spojování řady buněčných podnětů s JNK dráhou prostřednictvím malého proteinu Rac vázajícího GTP. Tyrozinfosforylovaný protein p130Cas je nezbytnou součástí dráhy vedoucí od integrinů k aktivaci JNK prostřednictvím Crk (Dolfi et al., 1998).

## 5.6 Dráha p130Cas-SD/Crk/DOCK180/Rac vedoucí k tvorbě podosomů/invadopodií (přes N-WASP)

Proteiny rodiny WASP (protein Wiskott-Aldrichova syndromu) jsou klíčovými regulátory aktinového cytoskeletu (Machesky et al., 1999). WASP byl původně identifikován jako genový produkt, jehož mutace je zodpovědná za lidské onemocnění zvané Wiskott-Aldrichův syndrom. WASP je exprimován výhradně v hematopoetických buňkách (Derry et al., 1994), další izoforma proteinu WASP byla později izolována z mozku a nazývána N-WASP (z „neural“ WASP), ačkoli je ve skutečnosti široce exprimována (Miki et al., 1996). Dalším členem rodiny proteinů WASP je protein Scar. Scar byl nezávisle izolován dvěma výzkumnými skupinami v roce 1998. Scar1 (suppressor of cAR), je lidský homolog proteinu Scar1 nalezeného v organismu *Dictyostelium*, zde se předpokládá, že Scar spojuje receptory spojené s G-proteinem s aktinovým cytoskeletem (Bear et al., 1998). Jedna skupina zachovala název Scar (Machesky and Insall, 1998), druhá skupina představila tento protein pod názvem WAVE (Miki et al., 1998) a oba názvy jsou používány.

V několika různých studiích bylo prokázáno, že komplex N-WASP a Arp2/3 je součástí podosomů (Linder et al., 1999; Mizutani et al., 2002). Zatímco N-WASP a komplex Arp2/3 hrají roli při tvorbě invadopodií, proteiny WAVE/Scar nemají vliv na vznik invadopodií. Cdc42, Nck1 a WIP jsou nezbytné pro tvorbu invadopodií jako regulátory N-WASP. Zajímavé je, že kofilin není nutný pro tvorbu invadopodia, ale je vyžadován pro zrání plně funkčních invadopodií. Pro studium mechanismu vzniku invadopodií využili časosběrnou mikroskopii s buněčnou linií MTLn3. Vysoce metastatické buňky MTLn3 tvoří invadopodia, na rozdíl od nemetastatických MTC buněk, což naznačuje přímou korelaci mezi schopností tvořit invadopodia a metastatickým potenciálem mesenchymálně invadujících rakovinných buněk (Yamaguchi et al., 2005).

## 5.7 Dráha přes Cdc42 vedoucí k tvorbě invadopodií

Malá GTPáza Cdc42 reguluje polymeraci aktinu, prostřednictvím proteinu N-WASP, který přímo aktivuje komplex Arp2/3. Dráha Cdc42/N-WASP pravděpodobně představuje pouze jeden z několika buněčných mechanismů, které řídí sestavování aktinových vláken prostřednictvím komplexu Arp2/3 (Rohatgi et al., 1999). Cdc42 reguluje aktivitu N-WASP nepřímo prostřednictvím proteinu Toca-1. Toca-1 váže N-WASP i Cdc42 a je členem evolučně konzervované proteinové rodiny. Toca-1 může iniciovat tvorbu invadopodií aktivací komplexu N-WASP/WIP (Ho et al., 2004).

Bylo také zjištěno, že existuje více typů invadopodií, krátkodobá pohyblivá invadopodia a stacionární dlouhodobá invadopodia. Zdá se, že stacionární invadopodia mají silný kontakt se substrátem, vyčnívají do matrix a provádějí její degradaci. Kromě toho bylo často pozorováno, že dlouhodobá

invadopodia se pohybovala po vzniku a poté se stala nehybnou. Proto je možné, že krátkodobá pohybová invadopodia jsou předchůdci plně funkčních invadopodií (Yamaguchi et al., 2005).

## 6 Úloha proteinu p130Cas v nádorech

Charakteristiky nádorů zahrnují šest biologických schopností získaných během vícestupňového vývoje. Patří mezi ně trvalá signalizace pro růst a dělení buněk, vyhýbání se signálům potlačujícím růst buněk, odolávání buněčné smrti, schopnost neomezené replikace, indukce angiogeneze a aktivace invazivity a metastázování (Hanahan and Weinberg, 2011).

Existuje mnoho důkazů, že fosforylace substrátové domény p130Cas přispívá k migraci buněk a invazivitě, motivy YDXP jsou nepostradatelné pro organizaci aktinových stresových vláken. p130Cas deficientní myši embryonální fibroblasty vykazují defekty v migraci, tuto schopnost je možné obnovit po přidání WT p130Cas. Migrace zůstane neobnovena po přidání mutované formy p130Cas, které chybí substrátová doména (Huang et al., 2002). Sestavení proteinového komplexu p130Cas/Crk slouží jako molekulární přepínač, který naprogramuje buňku k migraci na extracelulární matici, což v konečném důsledku vede k šíření nádorů (Klemke et al., 1998). Narušením vazby mezi proteiny p130Cas a Crk je migrace zastavena (Cho and Klemke, 2000). Bylo také prokázáno, že i zkrácená fosforylovaná substrátová doména p130Cas (fragment obsahující motivy 6–10) je dostatečná pro migraci a tvorbu metastáz *in vivo* (Kumbrink et al., 2016). Mechanismus, kterým tyroziny v opakujících se motivech na substrátové doméně přispívají k invazivním vlastnostem, je prostřednictvím aktivace signalizačních drah vedoucích k sestavení podosomů/invadopodií (Brábek et al., 2005).

Lidský ortholog p130Cas (nazvaný BCAR1) byl identifikován ve funkčním screeningu na geny zapojené do rezistence buněk karcinomu prsu na antiestrogenní léky (Brinkman et al., 2000). Analýza exprese proteinu BCAR1/p130Cas v primárním karcinomu prsu vedla ke dvěma zjištěním. Zaprvé, relativně vysoká exprese BCAR1/p130Cas v primárních nádorech prsu je spojena s rychlým návratem onemocnění. Riziko relapsu bylo o 62% vyšší u pacientů, jejichž nádory měly vysoké hladiny BCAR1/p130Cas než u pacientů, jejichž nádory měly nedetekovatelné hladiny proteinu BCAR1/p130Cas. Za druhé, vysoká úroveň exprese BCAR1/p130Cas v primárních nádorech (ve srovnání s nádory bez detekovatelné exprese BCAR1/p130Cas) je spojena s horší odpovědí na léčbu tamoxifenem (van der Flier et al., 2000). NEDD9 (protein z rodiny CAS) je také nadměrně exprimován v lidských karcinomech prsu oproti normální prsní tkáni (McLaughlin et al., 2014) a má důležitou úlohu v metastázování (Kim et al., 2006).

## Závěr

Protein p130Cas byl objeven před více než 30 lety a od té doby je stále v centru pozornosti molekulární biologie. Tento protein, který byl poprvé identifikován v souvislosti s buněčnou transformací onkogeny *v-src* a *v-crk*, je složen z SH3 domény, prolin bohaté domény, podrobně popsané substrátové domény, serin bohaté domény a C-terminální domény. Substrátová doména proteinu p130Cas obsahuje 15 opakování motivu YXXP. Samozřejmě probíhaly četné spekulace, proč je tento motiv přítomen v tolika repeticích.

Substrátová doména je hlavní místo, kde je p130Cas fosforylován na tyrozinových zbytcích kinázami rodiny Src. Bylo dokázáno, že fosforylace probíhá procesivním mechanismem. Kináza ale nenásleduje žádné povinné pořadí, tyrozinové zbytky nejsou totiž kineticky rozlišitelné. Na fosforylované tyroziny se váže další adaptorový protein Crk, který dále spouští různé signální dráhy vedoucí k migraci buněk nebo k proliferaci. Signální dráhy by se daly rozdělit na dvě hlavní větve: a) signální dráha vedoucí přes p130Cas SD/Crk/DOCK180/Rac/proteiny ovlivňující dynamiku aktinového cytoskeletu a b) vedoucí přes p130Cas SD/Crk/JNK/MMP2/9. První zmíněná signální dráha vede k tvorbě lamelipodií. Lamelipodia jsou široké aktinové protruze vyčnívající z okraje buněk. Slouží k migraci buněk a nerozkládají proteiny ECM. Zmíněná dráha se podílí na tvorbě lamelipodií, ale přes proteiny N-WASP a Arp2/3 může aktivovat aktinovou dynamiku i v podosomech/invadopodiích. Podosomy i invadopodia rozkládají ECM. Podosomy se nacházejí většinou v normálních buňkách (monocytární buňky, endoteliální buňky a buňky hladkého svalstva), invadopodia jsou naopak tvořena invazivními rakovinnými buňkami. Hlavní způsob, jak dosáhnout řízené degradace ECM, je přítomnost speciálních enzymů – matrixových metaloproteináz. Kromě proteinu Crk se na substrátovou doménu p130Cas váže protein Nck, tento protein je také součástí signalizace vedoucí k degradaci ECM a migraci buněk.

Substrátová doména p130Cas je za normálních podmínek v neroztaženém stavu a tyroziny tak nejsou dostupné pro fosforylaci. Mechanické roztažení buňky je přeneseno na substrátovou doménu proteinu p130Cas, který je ukotven svou N- a C-terminální doménou do FA. Poté co dojde k natažení substrátové domény jsou již tyroziny přístupné pro fosforylaci. Protein p130Cas má roli přepínače, který mění mechanické signály do biochemických.

V poslední kapitole je zmíněno, že lidský ortholog adaptorového proteinu p130Cas BCAR1 je v nadměrném množství detekován u některých lidských karcinomů. Zásadní roli hraje v karcinomu prsu, vysoká exprese BCAR1 je spojena s vysokým rizikem relapsu a s horší odpovědí na léčbu tamoxifenem. Protein p130Cas je tedy potenciálně vhodným cílem pro protinádorovou a protimetastatickou terapii.

## Seznam obrazových příloh

Obrázek 1: Strukturální organizace proteinu p130Cas a jeho vazební partneři.....	4
Obrázek 2: Substrátová doména p130Cas s motivy YDXP a YQXP.....	5
Obrázek 3: Model signalizace přes substrátovou doménu proteinu p130Cas .....	9
Obrázek 4: Model pro regulaci p130Cas-závislého mechanosensingu .....	12
Obrázek 5: Růst invadopodií v různém prostředí .....	14
Obrázek 6: Srovnání c-CrkII a c-Crk-I .....	15
Obrázek 7: Model regulace vazebné aktivity proteinů Abl a Crk .....	16
Obrázek 8: Schematická organizace domén proteinů DOCK180 a ELMO .....	17
Obrázek 9: Struktura proteinů Nck.....	18
Obrázek 10: Aktinová remodelace v závislosti na proteinu Nck.....	19

## Seznam použité literatury

- Abassi, Y.A., Vuori, K., 2002. Tyrosine 221 in Crk regulates adhesion-dependent membrane localization of Crk and Rac and activation of Rac signaling. *EMBO J.* 21, 4571–4582. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf446>
- Akimoto, T., Okuhira, K., Aizawa, K., Wada, S., Honda, H., Fukubayashi, T., Ushida, T., 2013. Skeletal muscle adaptation in response to mechanical stress in p130cas<sup>-/-</sup> mice. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 304, C541–547. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00243.2012>
- Alexander, N.R., Branch, K.M., Parekh, A., Clark, E.S., Iwueke, I.C., Guelcher, S.A., Weaver, A.M., 2008. Extracellular matrix rigidity promotes invadopodia activity. *Curr. Biol.* 18, 1295–1299. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.090>
- Alexandropoulos, K., Baltimore, D., 1996. Coordinate activation of c-Src by SH3- and SH2-binding sites on a novel p130Cas-related protein. *Sin. Genes Dev.* 10, 1341–1355. <https://doi.org/10.1101/gad.10.11.1341>
- Bear, J.E., Rawls, J.F., Saxe, C.L., 1998. SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late Dictyostelium development. *J. Cell Biol.* 142, 1325–1335. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.5.1325>
- Birge, R.B., Fajardo, J.E., Mayer, B.J., Hanafusa, H., 1992. Tyrosine-phosphorylated epidermal growth factor receptor and cellular p130 provide high affinity binding substrates to analyze Crk-phosphotyrosine-dependent interactions in vitro. *J. Biol. Chem.* 267, 10588–10595.
- Birge, R.B., Kalodimos, C., Inagaki, F., Tanaka, S., 2009. Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. *Cell Communication and Signaling* 7, 13. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-7-13>
- Bladt, F., Aippersbach, E., Gelkop, S., Strasser, G.A., Nash, P., Tafuri, A., Gertler, F.B., Pawson, T., 2003. The murine Nck SH2/SH3 adaptors are important for the development of mesoderm-derived embryonic structures and for regulating the cellular actin network. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4586–4597. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.13.4586-4597.2003>
- Bouton, A.H., Riggins, R.B., Bruce-Staskal, P.J., 2001. Functions of the adapter protein Cas: signal convergence and the determination of cellular responses. *Oncogene* 20, 6448–6458. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204785>
- Brábek, J., Constancio, S.S., Shin, N.-Y., Pozzi, A., Weaver, A.M., Hanks, S.K., 2004. CAS promotes invasiveness of Src-transformed cells. *Oncogene* 23, 7406–7415. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207965>
- Brábek, J., Constancio, S.S., Siesser, P.F., Shin, N.-Y., Pozzi, A., Hanks, S.K., 2005. Crk-associated substrate tyrosine phosphorylation sites are critical for invasion and metastasis of SRC-transformed cells. *Mol. Cancer Res.* 3, 307–315. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0015>
- Briknarová, K., Nasertorabi, F., Havert, M.L., Eggleston, E., Hoyt, D.W., Li, C., Olson, A.J., Vuori, K., Ely, K.R., 2005. The serine-rich domain from Crk-associated substrate (p130cas) is a four-helix bundle. *J. Biol. Chem.* 280, 21908–21914. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501258200>
- Brinkman, A., van der Flier, S., Kok, E.M., Dorssers, L.C., 2000. BCAR1, a human homologue of the adapter protein p130Cas, and antiestrogen resistance in breast cancer cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 112–120. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.2.112>
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S.F., Tosello-Tramont, A.-C., Macara, I.G., Madhani, H., Fink, G.R., Ravichandran, K.S., 2002. Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat. Cell Biol.* 4, 574–582. <https://doi.org/10.1038/ncb824>
- Burridge, K., Turner, C.E., Romer, L.H., 1992. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J. Cell Biol.* 119, 893–903. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.4.893>
- Calalb, M.B., Polte, T.R., Hanks, S.K., 1995. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol. Cell. Biol.* 15, 954–963. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.2.954>



- Chaki, S.P., Barhoumi, R., Rivera, G.M., 2019. Nck adapter proteins promote podosome biogenesis facilitating extracellular matrix degradation and cancer invasion. *Cancer Med* 8, 7385–7398. <https://doi.org/10.1002/cam4.2640>
- Chen, M., She, H., Davis, E.M., Spicer, C.M., Kim, L., Ren, R., Le Beau, M.M., Li, W., 1998. Identification of Nck family genes, chromosomal localization, expression, and signaling specificity. *J. Biol. Chem.* 273, 25171–25178. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.39.25171>
- Chen, W.T., 1989. Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *J. Exp. Zool.* 251, 167–185. <https://doi.org/10.1002/jez.1402510206>
- Cho, S.Y., Klemke, R.L., 2000. Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 149, 223–236. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.1.223>
- Chou, M.M., Fajardo, J.E., Hanafusa, H., 1992. The SH2- and SH3-containing Nck protein transforms mammalian fibroblasts in the absence of elevated phosphotyrosine levels. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5834–5842. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.12.5834>
- Cunningham-Edmondson, A.C., Hanks, S.K., 2009. p130Cas substrate domain signaling promotes migration, invasion, and survival of estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 1, 39–52. <https://doi.org/10.2147/bcrt.s6255>
- Derry, J.M., Ochs, H.D., Francke, U., 1994. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 78, 635–644. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90528-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90528-2)
- Didsbury, J., Weber, R.F., Bokoch, G.M., Evans, T., Snyderman, R., 1989. rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J. Biol. Chem.* 264, 16378–16382.
- Dolfi, F., Garcia-Guzman, M., Ojaniemi, M., Nakamura, H., Matsuda, M., Vuori, K., 1998. The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 15394–15399. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15394>
- Donato, D.M., Ryzhova, L.M., Meenderink, L.M., Kaverina, I., Hanks, S.K., 2010. Dynamics and mechanism of p130Cas localization to focal adhesions. *J. Biol. Chem.* 285, 20769–20779. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.091207>
- Feller, S.M., Knudsen, B., Hanafusa, H., 1994a. c-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk. *EMBO J.* 13, 2341–2351.
- Feller, S.M., Posern, G., Voss, J., Kardinal, C., Sakkab, D., Zheng, J., Knudsen, B.S., 1998. Physiological signals and oncogenesis mediated through Crk family adapter proteins. *J. Cell. Physiol.* 177, 535–552. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199812\)177:4<535::AID-JCP5>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199812)177:4<535::AID-JCP5>3.0.CO;2-E)
- Feller, S.M., Ren, R., Hanafusa, H., Baltimore, D., 1994b. SH2 and SH3 domains as molecular adhesives: the interactions of Crk and Abl. *Trends Biochem. Sci.* 19, 453–458. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(94\)90129-5](https://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90129-5)
- Feng, S., Chen, J.K., Yu, H., Simon, J.A., Schreiber, S.L., 1994. Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science* 266, 1241–1247. <https://doi.org/10.1126/science.7526465>
- Fonseca, P.M., Shin, N.-Y., Brábek, J., Ryzhova, L., Wu, J., Hanks, S.K., 2004. Regulation and localization of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation. *Cellular Signalling* 16, 621–629. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2003.10.004>
- Friedl, P., Wolf, K., 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 3, 362–374. <https://doi.org/10.1038/nrc1075>
- Garton, A.J., Burnham, M.R., Bouton, A.H., Tonks, N.K., 1997. Association of PTP-PEST with the SH3 domain of p130cas; a novel mechanism of protein tyrosine phosphatase substrate recognition. *Oncogene* 15, 877–885. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201279>
- Gemperle, J., Dibus, M., Koudelková, L., Rosel, D., Brábek, J., 2019. The interaction of p130Cas with PKN3 promotes malignant growth. *Mol Oncol* 13, 264–289. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12401>
- Gimona, M., Buccione, R., Courtneidge, S.A., Linder, S., 2008. Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.01.005>

- Gumienny, T.L., Brugnera, E., Tosello-Trampont, A.C., Kinchen, J.M., Haney, L.B., Nishiwaki, K., Walk, S.F., Nemergut, M.E., Macara, I.G., Francis, R., Schedl, T., Qin, Y., Van Aelst, L., Hengartner, M.O., Ravichandran, K.S., 2001. CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell* 107, 27–41. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00520-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00520-7)
- Guo, W., Giancotti, F.G., 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 816–826. <https://doi.org/10.1038/nrm1490>
- Hamasaki, K., Mimura, T., Morino, N., Furuya, H., Nakamoto, T., Aizawa, S., Morimoto, C., Yazaki, Y., Hirai, H., Nojima, Y., 1996. Src kinase plays an essential role in integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate p130Cas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222, 338–343. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0745>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harte, M.T., Hildebrand, J.D., Burnham, M.R., Bouton, A.H., Parsons, J.T., 1996. p130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 13649–13655. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.23.13649>
- Hasegawa, H., Kiyokawa, E., Tanaka, S., Nagashima, K., Gotoh, N., Shibuya, M., Kurata, T., Matsuda, M., 1996. DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1770–1776. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.4.1770>
- Hattori, M., Minato, N., 2003. Rap1 GTPase: functions, regulation, and malignancy. *J. Biochem.* 134, 479–484. <https://doi.org/10.1093/jb/mvg180>
- Ho, H.-Y.H., Rohatgi, R., Lebensohn, A.M., Le Ma, null, Li, J., Gygi, S.P., Kirschner, M.W., 2004. Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell* 118, 203–216. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.027>
- Honda, H., Nakamoto, T., Sakai, R., Hirai, H., 1999. p130(Cas), an assembling molecule of actin filaments, promotes cell movement, cell migration, and cell spreading in fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 25–30. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1162>
- Honda, H., Oda, H., Nakamoto, T., Honda, Z., Sakai, R., Suzuki, T., Saito, T., Nakamura, K., Nakao, K., Ishikawa, T., Katsuki, M., Yazaki, Y., Hirai, H., 1998. Cardiovascular anomaly, impaired actin bundling and resistance to Src-induced transformation in mice lacking p130Cas. *Nat. Genet.* 19, 361–365. <https://doi.org/10.1038/1246>
- Hoorn, H. van, Donato, D.M., Balcioglu, H.E., Danen, E.H., Schmidt, T., 2018. p130Cas contributes to cellular mechanosensing and force exertion. *bioRxiv* 371021. <https://doi.org/10.1101/371021>
- Huang, J., Hamasaki, H., Nakamoto, T., Honda, H., Hirai, H., Saito, M., Takato, T., Sakai, R., 2002. Differential Regulation of Cell Migration, Actin Stress Fiber Organization, and Cell Transformation by Functional Domains of Crk-associated Substrate. *J. Biol. Chem.* 277, 27265–27272. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203063200>
- Janoštiak, R., Brábek, J., Auernheimer, V., Tatárová, Z., Lautscham, L.A., Dey, T., Gemperle, J., Merkel, R., Goldmann, W.H., Fabry, B., Rösel, D., 2014a. CAS directly interacts with vinculin to control mechanosensing and focal adhesion dynamics. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 727–744. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1450-x>
- Janoštiak, R., Pataki, A.C., Brábek, J., Rösel, D., 2014b. Mechanosensors in integrin signaling: the emerging role of p130Cas. *Eur. J. Cell Biol.* 93, 445–454. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.07.002>
- Janoštiak, R., Tolde, O., Brůhová, Z., Novotný, M., Hanks, S.K., Rösel, D., Brábek, J., 2011. Tyrosine phosphorylation within the SH3 domain regulates CAS subcellular localization, cell migration, and invasiveness. *Mol. Biol. Cell* 22, 4256–4267. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-03-0207>
- Janssen, H., Marynen, P., 2006. Interaction partners for human ZNF384/CIZ/NMP4--zyxin as a mediator for p130CAS signaling? *Exp. Cell Res.* 312, 1194–1204. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.02.001>

- Jockusch, B.M., Bubeck, P., Giehl, K., Kroemker, M., Moschner, J., Rothkegel, M., Rüdiger, M., Schlüter, K., Stanke, G., Winkler, J., 1995. The molecular architecture of focal adhesions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 379–416. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.11.110195.002115>
- Kain, K.H., Klemke, R.L., 2001. Inhibition of cell migration by Abl family tyrosine kinases through uncoupling of Crk-CAS complexes. *J. Biol. Chem.* 276, 16185–16192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100095200>
- Kanner, S.B., Reynolds, A.B., Wang, H.C., Vines, R.R., Parsons, J.T., 1991. The SH2 and SH3 domains of pp60src direct stable association with tyrosine phosphorylated proteins p130 and p110. *EMBO J.* 10, 1689–1698.
- Kim, M., Gans, J.D., Nogueira, C., Wang, A., Paik, J.-H., Feng, B., Brennan, C., Hahn, W.C., Cordon-Cardo, C., Wagner, S.N., Flotte, T.J., Duncan, L.M., Granter, S.R., Chin, L., 2006. Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell* 125, 1269–1281. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.008>
- Kiosses, W.B., Shattil, S.J., Pampori, N., Schwartz, M.A., 2001. Rac recruits high-affinity integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 3 to lamellipodia in endothelial cell migration. *Nat. Cell Biol.* 3, 316–320. <https://doi.org/10.1038/35060120>
- Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Sugimura, H., Kurata, T., Matsuda, M., 1998a. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.* 12, 3331–3336. <https://doi.org/10.1101/gad.12.21.3331>
- Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kurata, T., Sugimura, H., Matsuda, M., 1998b. Evidence that DOCK180 up-regulates signals from the CrkII-p130(Cas) complex. *J. Biol. Chem.* 273, 24479–24484. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.38.24479>
- Klemke, R.L., Leng, J., Molander, R., Brooks, P.C., Vuori, K., Cheresch, D.A., 1998. CAS/Crk coupling serves as a “molecular switch” for induction of cell migration. *J. Cell Biol.* 140, 961–972. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.4.961>
- Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C., Pawson, T., 1991. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252, 668–674. <https://doi.org/10.1126/science.1708916>
- Komander, D., Patel, M., Laurin, M., Fradet, N., Pelletier, A., Barford, D., Côté, J.-F., 2008. An alpha-helical extension of the ELMO1 pleckstrin homology domain mediates direct interaction to DOCK180 and is critical in Rac signaling. *Mol. Biol. Cell* 19, 4837–4851. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-04-0345>
- Kumbrink, J., de la Cueva, A., Soni, S., Sailer, N., Kirsch, K.H., 2016. A truncated phosphorylated p130Cas substrate domain is sufficient to drive breast cancer growth and metastasis formation in vivo. *Tumour Biol.* 37, 10665–10673. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4902-8>
- Law, S.F., Estojak, J., Wang, B., Mysliwiec, T., Kruh, G., Golemis, E.A., 1996. Human enhancer of filamentation 1, a novel p130cas-like docking protein, associates with focal adhesion kinase and induces pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3327–3337. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.7.3327>
- Lim, S.-T., Mikolon, D., Stupack, D.G., Schlaepfer, D.D., 2008. FERM control of FAK function: implications for cancer therapy. *Cell Cycle* 7, 2306–2314. <https://doi.org/10.4161/cc.6367>
- Linder, S., Nelson, D., Weiss, M., Aepfelbacher, M., 1999. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 9648–9653. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9648>
- Liu, F., Hill, D.E., Chernoff, J., 1996. Direct binding of the proline-rich region of protein tyrosine phosphatase 1B to the Src homology 3 domain of p130(Cas). *J. Biol. Chem.* 271, 31290–31295. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.49.31290>
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G., 2013. The Hallmarks of Aging. *Cell* 153, 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Lu, M., Ravichandran, K.S., 2006. Dock180-ELMO cooperation in Rac activation. *Meth. Enzymol.* 406, 388–402. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)06028-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)06028-9)

- Luo, W., Slebos, R.J., Hill, S., Li, M., Brábek, J., Amanchy, R., Chaerkady, R., Pandey, A., Ham, A.-J.L., Hanks, S.K., 2008. Global impact of oncogenic Src on a phosphotyrosine proteome. *J. Proteome Res.* 7, 3447–3460. <https://doi.org/10.1021/pr800187n>
- Machesky, L.M., Insall, R.H., 1998. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* 8, 1347–1356. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)00015-3](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)00015-3)
- Machesky, L.M., Mullins, R.D., Higgs, H.N., Kaiser, D.A., Blanchoin, L., May, R.C., Hall, M.E., Pollard, T.D., 1999. Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 3739–3744. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3739>
- Machiyama, H., Hirata, H., Loh, X.K., Kanchi, M.M., Fujita, H., Tan, S.H., Kawauchi, K., Sawada, Y., 2014. Displacement of p130Cas from focal adhesions links actomyosin contraction to cell migration. *J. Cell. Sci.* 127, 3440–3450. <https://doi.org/10.1242/jcs.143438>
- Matsuda, M., Mayer, B.J., Fukui, Y., Hanafusa, H., 1990. Binding of transforming protein, P47gag-crk, to a broad range of phosphotyrosine-containing proteins. *Science* 248, 1537–1539. <https://doi.org/10.1126/science.1694307>
- Matsuda, M., Tanaka, S., Nagata, S., Kojima, A., Kurata, T., Shibuya, M., 1992. Two species of human CRK cDNA encode proteins with distinct biological activities. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3482–3489. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.8.3482>
- Mayer, B.J., Hamaguchi, M., Hanafusa, H., 1988. A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature* 332, 272–275. <https://doi.org/10.1038/332272a0>
- McLaughlin, S.L., Ice, R.J., Rajulapati, A., Kozyulina, P.Y., Livengood, R.H., Kozyreva, V.K., Loskutov, Y.V., Culp, M.V., Weed, S.A., Ivanov, A.V., Pugacheva, E.N., 2014. NEDD9 depletion leads to MMP14 inactivation by TIMP2 and prevents invasion and metastasis. *Mol. Cancer Res.* 12, 69–81. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0300>
- Mierke, C.T., Kollmannsberger, P., Zitterbart, D.P., Smith, J., Fabry, B., Goldmann, W.H., 2008. Mechano-coupling and regulation of contractility by the vinculin tail domain. *Biophys. J.* 94, 661–670. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.108472>
- Miki, H., Miura, K., Takenawa, T., 1996. N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J.* 15, 5326–5335.
- Miki, H., Suetsugu, S., Takenawa, T., 1998. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.* 17, 6932–6941. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.23.6932>
- Miyazaki, T., Zhao, Z., Ichihara, Y., Yoshino, D., Imamura, T., Sawada, K., Hayano, S., Kamioka, H., Mori, S., Hirata, H., Araki, K., Kawauchi, K., Shigemoto, K., Tanaka, S., Bonewald, L.F., Honda, H., Shinohara, M., Nagao, M., Ogata, T., Harada, I., Sawada, Y., 2019. Mechanical regulation of bone homeostasis through p130Cas-mediated alleviation of NF- $\kappa$ B activity. *Sci Adv* 5, eaau7802. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau7802>
- Mizutani, K., Miki, H., He, H., Maruta, H., Takenawa, T., 2002. Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Res.* 62, 669–674.
- Morris, D.C., Popp, J.L., Tang, L.K., Gibbs, H.C., Schmitt, E., Chaki, S.P., Bywaters, B.C., Yeh, A.T., Porter, W.W., Burghardt, R.C., Barhoumi, R., Rivera, G.M., 2017. Nck deficiency is associated with delayed breast carcinoma progression and reduced metastasis. *Mol. Biol. Cell* 28, 3500–3516. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-02-0106>
- Muller, A.J., Pendergast, A.M., Havlik, M.H., Puil, L., Pawson, T., Witte, O.N., 1992. A limited set of SH2 domains binds BCR through a high-affinity phosphotyrosine-independent interaction. *Molecular and Cellular Biology* 12, 5087–5093. <https://doi.org/10.1128/MCB.12.11.5087>
- Nakamoto, T., Sakai, R., Honda, H., Ogawa, S., Ueno, H., Suzuki, T., Aizawa, S., Yazaki, Y., Hirai, H., 1997. Requirements for localization of p130cas to focal adhesions. *Mol Cell Biol* 17, 3884–3897.

- Nakamoto, T., Sakai, R., Ozawa, K., Yazaki, Y., Hirai, H., 1996. Direct binding of C-terminal region of p130Cas to SH2 and SH3 domains of Src kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 8959–8965. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.15.8959>
- Nakamoto, T., Yamagata, T., Sakai, R., Ogawa, S., Honda, H., Ueno, H., Hirano, N., Yazaki, Y., Hirai, H., 2000. CIZ, a zinc finger protein that interacts with p130(cas) and activates the expression of matrix metalloproteinases. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1649–1658. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.5.1649-1658.2000>
- Nojima, Y., Morino, N., Mimura, T., Hamasaki, K., Furuya, H., Sakai, R., Sato, T., Tachibana, K., Morimoto, C., Yazaki, Y., 1995. Integrin-mediated cell adhesion promotes tyrosine phosphorylation of p130Cas, a Src homology 3-containing molecule having multiple Src homology 2-binding motifs. *J. Biol. Chem.* 270, 15398–15402. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.25.15398>
- Nolan, K.M., Barrett, K., Lu, Y., Hu, K.Q., Vincent, S., Settleman, J., 1998. Myoblast city, the Drosophila homolog of DOCK180/CED-5, is required in a Rac signaling pathway utilized for multiple developmental processes. *Genes Dev.* 12, 3337–3342. <https://doi.org/10.1101/gad.12.21.3337>
- Orr, A.W., Sanders, J.M., Bevard, M., Coleman, E., Sarembock, I.J., Schwartz, M.A., 2005. The subendothelial extracellular matrix modulates NF-kappaB activation by flow: a potential role in atherosclerosis. *J. Cell Biol.* 169, 191–202. <https://doi.org/10.1083/jcb.200410073>
- Oser, M., Dovas, A., Cox, D., Condeelis, J., 2011. Nck1 and Grb2 localization patterns can distinguish invadopodia from podosomes. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.08.006>
- Patwardhan, P., Shen, Y., Goldberg, G.S., Miller, W.T., 2006. Individual Cas phosphorylation sites are dispensable for processive phosphorylation by Src and anchorage-independent cell growth. *J. Biol. Chem.* 281, 20689–20697. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602311200>
- Pawson, T., 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature* 373, 573–580. <https://doi.org/10.1038/373573a0>
- Pellicena, P., Miller, W.T., 2001. Processive phosphorylation of p130Cas by Src depends on SH3-polyproline interactions. *J. Biol. Chem.* 276, 28190–28196. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100055200>
- Pellicena, P., Stowell, K.R., Miller, W.T., 1998. Enhanced phosphorylation of Src family kinase substrates containing SH2 domain binding sites. *J. Biol. Chem.* 273, 15325–15328. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.25.15325>
- Pollard, T.D., Blanchoin, L., Mullins, R.D., 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29, 545–576. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.545>
- Pollard, T.D., Borisy, G.G., 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453–465. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00120-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00120-x)
- Polte, T.R., Hanks, S.K., 1995. Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10678–10682.
- Reichman, C.T., Mayer, B.J., Keshav, S., Hanafusa, H., 1992. The product of the cellular crk gene consists primarily of SH2 and SH3 regions. *Cell Growth Differ.* 3, 451–460.
- Reynolds, A.B., Roesel, D.J., Kanner, S.B., Parsons, J.T., 1989. Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Mol. Cell. Biol.* 9, 629–638. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.2.629>
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., Hall, A., 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401–410. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90164-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90164-8)
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., Kirschner, M.W., 1999. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97, 221–231. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80732-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80732-1)

- Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H.Y., Kirschner, M.W., Mayer, B.J., 2001. Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 26448–26452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103856200>
- Ruest, P.J., Shin, N.Y., Polte, T.R., Zhang, X., Hanks, S.K., 2001. Mechanisms of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation by FAK and Src. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7641–7652. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.22.7641-7652.2001>
- Sakai, R., Iwamatsu, A., Hirano, N., Ogawa, S., Tanaka, T., Mano, H., Yazaki, Y., Hirai, H., 1994. A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *EMBO J.* 13, 3748–3756.
- Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B.J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., Sheetz, M.P., 2006. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* 127, 1015–1026. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.044>
- Schaller, M.D., Borgman, C.A., Cobb, B.S., Vines, R.R., Reynolds, A.B., Parsons, J.T., 1992. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 5192–5196. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.11.5192>
- Schaller, M.D., Hildebrand, J.D., Shannon, J.D., Fox, J.W., Vines, R.R., Parsons, J.T., 1994. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1680–1688. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.3.1680>
- Schaller, M.D., Parsons, J.T., 1995. pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2635–2645. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.5.2635>
- Schlaepfer, D.D., Broome, M.A., Hunter, T., 1997. Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Mol Cell Biol* 17, 1702–1713.
- Scott, M.P., Miller, W.T., 2000. A peptide model system for processive phosphorylation by Src family kinases. *Biochemistry* 39, 14531–14537. <https://doi.org/10.1021/bi001850u>
- Sévajol, M., Reiser, J.-B., Chouquet, A., Pérard, J., Ayala, I., Gans, P., Kleman, J.-P., Housset, D., 2012. The C-terminal polyproline-containing region of ELMO contributes to an increase in the life-time of the ELMO-DOCK complex. *Biochimie* 94, 823–828. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.11.014>
- Shin, N.-Y., Dise, R.S., Schneider-Mergener, J., Ritchie, M.D., Kilkenny, D.M., Hanks, S.K., 2004. Subsets of the major tyrosine phosphorylation sites in Crk-associated substrate (CAS) are sufficient to promote cell migration. *J. Biol. Chem.* 279, 38331–38337. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404675200>
- Singh, M.K., Dadke, D., Nicolas, E., Serebriiskii, I.G., Apostolou, S., Canutescu, A., Egleston, B.L., Golemis, E.A., 2008. A novel Cas family member, HEPL, regulates FAK and cell spreading. *Mol. Biol. Cell* 19, 1627–1636. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-09-0953>
- Songyang, Z., Carraway, K.L., Eck, M.J., Harrison, S.C., Feldman, R.A., Mohammadi, M., Schlessinger, J., Hubbard, S.R., Smith, D.P., Eng, C., 1995. Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* 373, 536–539. <https://doi.org/10.1038/373536a0>
- Takino, T., Tamura, M., Miyamori, H., Araki, M., Matsumoto, K., Sato, H., Yamada, K.M., 2003. Tyrosine phosphorylation of the CrkII adaptor protein modulates cell migration. *J. Cell. Sci.* 116, 3145–3155. <https://doi.org/10.1242/jcs.00632>
- Tamada, M., Sheetz, M.P., Sawada, Y., 2004. Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch. *Dev. Cell* 7, 709–718. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.08.021>
- Tanaka, S., Morishita, T., Hashimoto, Y., Hattori, S., Nakamura, S., Shibuya, M., Matuoka, K., Takenawa, T., Kurata, T., Nagashima, K., 1994. C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 3443–3447. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.3443>

- Tolde, O., Rösel, D., Veselý, P., Folk, P., Brábek, J., 2010. The structure of invadopodia in a complex 3D environment. *European Journal of Cell Biology* 89, 674–680. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.04.003>
- van der Flier, S., Brinkman, A., Look, M.P., Kok, E.M., Meijer-van Gelder, M.E., Klijn, J.G., Dorssers, L.C., Foekens, J.A., 2000. Bcl-1/p130Cas protein and primary breast cancer: prognosis and response to tamoxifen treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 120–127. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.2.120>
- Vuori, K., Hirai, H., Aizawa, S., Ruoslahti, E., 1996. Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2606–2613. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.6.2606>
- Wang, Y., McNiven, M.A., 2012. Invasive matrix degradation at focal adhesions occurs via protease recruitment by a FAK-p130Cas complex. *J. Cell Biol.* 196, 375–385. <https://doi.org/10.1083/jcb.201105153>
- Welch, M.D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D.A., Mitchison, T.J., 1998. Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* 281, 105–108. <https://doi.org/10.1126/science.281.5373.105>
- Wisniewska, M., Bossenmaier, B., Georges, G., Hesse, F., Dangel, M., Künkele, K.-P., Ioannidis, I., Huber, R., Engh, R.A., 2005. The 1.1 Å resolution crystal structure of the p130cas SH3 domain and ramifications for ligand selectivity. *J. Mol. Biol.* 347, 1005–1014. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.02.017>
- Xing, Z., Chen, H.C., Nowlen, J.K., Taylor, S.J., Shalloway, D., Guan, J.L., 1994. Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain. *Mol. Biol. Cell* 5, 413–421. <https://doi.org/10.1091/mbc.5.4.413>
- Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempiak, S., Sarmiento, C., Coniglio, S., Symons, M., Segall, J., Eddy, R., Miki, H., Takenawa, T., Condeelis, J., 2005. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J. Cell Biol.* 168, 441–452. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407076>
- Yamakita, Y., Totsukawa, G., Yamashiro, S., Fry, D., Zhang, X., Hanks, S.K., Matsumura, F., 1999. Dissociation of FAK/p130(CAS)/c-Src complex during mitosis: role of mitosis-specific serine phosphorylation of FAK. *J. Cell Biol.* 144, 315–324. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.2.315>
- Yokoyama, N., Miller, W.T., 2001. Protein phosphatase 2A interacts with the Src kinase substrate p130(CAS). *Oncogene* 20, 6057–6065. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204735>
- Zhou, J., Zeng, Y., Cui, L., Chen, X., Stauffer, S., Wang, Z., Yu, F., Lele, S.M., Talmon, G.A., Black, A.R., Chen, Y., Dong, J., 2018. Zyxin promotes colon cancer tumorigenesis in a mitotic phosphorylation-dependent manner and through CDK8-mediated YAP activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E6760–E6769. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800621115>